

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2002-504122

(P2002-504122A)

(43) 公表日 平成14年2月5日(2002.2.5)

(51) Int.Cl.	識別記号	F I	備考(参考)
A 6 1 K 31/69		A 6 1 K 31/69	
31/43		31/43	
31/545		31/545	
A 6 1 P 31/04		A 6 1 P 31/04	
43/00		43/00	
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 75 頁)			

(21) 出願番号 特願平11-503192
 (86) (22) 出願日 平成10年6月12日(1998.6.12)
 (85) 翻訳文提出日 平成11年12月13日(1999.12.13)
 (86) 国際出願番号 P C T / U S 9 8 / 1 2 0 9 6
 (87) 国際公開番号 W O 9 8 / 5 6 3 9 2
 (87) 国際公開日 平成10年12月17日(1998.12.17)
 (31) 優先権主張番号 6 0 / 0 4 9 , 9 9 2
 (32) 優先日 平成9年6月13日(1997.6.13)
 (33) 優先権主張国 米国 (U S)

(71) 出願人 ノースウエスタン ユニバーシティー
 アメリカ合衆国 60201-3135 イリノイ
 州 エバンストン メープル アベニュー
 1801
 (72) 発明者 ウェストン、グラディ スコット
 アメリカ合衆国 60187 イリノイ州 ウ
 ィートン ウィートン センター 3 ア
 パートメント 614
 (72) 発明者 ショイチャット、ブライアン ケイ
 アメリカ合衆国 60614 イリノイ州 シ
 カゴ ダブリュ. セント ポール アベニ
 ュー 230 ナンバー1
 (74) 代理人 弁理士 恩田 博宣

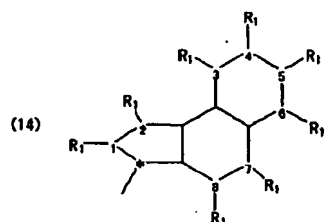
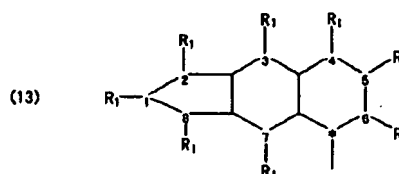
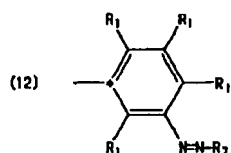
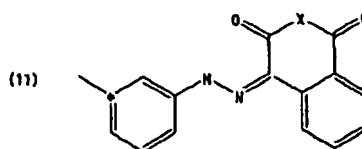
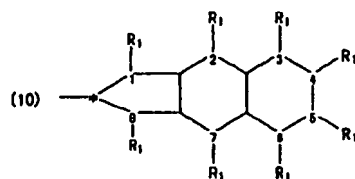
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ペータラクタマーゼ阻害剤及びその使用方法

(57) 【要約】

本発明はペータラクタマーゼに対する新規な非ペータラクタム阻害剤を提供する。特に本発明は、明細書に述べた式(1)のボロン酸である阻害剤を提供する。これらの化合物をペータラクタム抗生物質と共に用いて、ペータラクタム抗生物質耐性細菌感染を治療することができる。これらの化合物も、単独で抗菌性を有する。最後に、本発明は、これらの化合物を含有する薬剤組成物を提供する。

(3)



ここで、

環の系(2)、(3)、(4)、(5)、(6)、(7)、(8)、(9)又は(10)は芳香族又は非芳香族のどちらでもよく、

原子の中心*はキラル化合物の場合、(R)又は(S)であり、

位置1、2、3、4、5、6、7、又は8はそれぞれ独立的にC、N、O又はSであり、

R₁からR₆はそれぞれ独立的に、孤立電子対、H、B(OH)₂、ハロゲン原子、CF₃、CH₂CF₃、CCl₃、CH₂CCl₃、CBr₃、CH₂CBr₃、NO₂、低級アルキル、CO₂H、CHCHCOOH、CH₂CH₂CH₂COOH、SO₃H、PO₃H、OSO₃H、OPO₃H、OH、NH₂、CONH₂、COCH₃、OCH₃、又はフェニルボロン酸であるが、ただし、R₂、R₃、R₄、R₅、及びR₆は同時にすべてHであることはなく、R₃、R₄、R₅、及びR₆がHであ

るときはR₂は低級アルキルではなく、R₂、R₄、R₅、及びR₆がHであるときはR₃はNH₂、OH又は低級アルキルではなく、R₂、R₃、R₅、及びR₆がHで

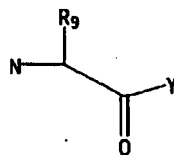
(4)

あるときは、 R_4 は低級アルキルではなく、

R_7 は孤立電子対、 H 、 $B(OH)_2$ 、ハロゲン原子、 CF_3 、 CCl_3 、 $CB r_3$ 、 CH_2CF_3 、 CH_2CCl_3 、 $CH_2CB r_3$ 、 NO_2 、 $CONH_2$ 、 $COCH_3$ 、 OCH_3 、低級アルキル、アリル、1以上の置換基 R_8 で置換されたアリル、ヘテロアリル、又は1以上の置換基 R_8 で置換されたヘテロアリルであり、

R_8 はそれぞれ独立的に、孤立電子対、 H 、 $B(OH)_2$ 、ハロゲン原子、 $C F_3$ 、 CCl_3 、 $CB r_3$ 、 CH_2CF_3 、 CH_2CCl_3 、 $CH_2CB r_3$ 、 NO_2 、低級アルキル、 O 、 N 、 S 、 OH 、 NH_2 、 $N(CH_3)_2$ 、 $N(CH_3)CH_2CH_3$ 、 $NCOCH_3$ 、 $COOH$ 、 $CHCHCOOH$ 、 $CH_2CH_2CH_2COOH$ 、 $CONH_2$ 、 $COCH_3$ 、 OCH_3 、 OCl 、又はフェニルボロン酸であり、

X は O 、 NH 、 NCH_3 、又は



のいずれかであり、

Y は OH 、 NH_2 、 NCH_3 、 $N(CH_3)_2$ 、 $NHCOCH_3$ 、又は $NHCOCH_2COOH$ であり、

R_9 は、孤立電子対、 H 、 $B(OH)_2$ 、ハロゲン原子、 CF_3 、 CCl_3 、 $CB r_3$ 、 CH_2CF_3 、 CH_2CCl_3 、 $CH_2CB r_3$ 、 NO_2 、 CO_2H 、 $CHCHCOOH$ 、 $CH_2CH_2CH_2COOH$ 、 SO_3H 、 PO_3H 、 OSO_3H 、 OPO_3H 、 OH 、 NH_2 、 $CONH_2$ 、 $COCH_3$ 、 OCH_3 、フェニルボロン酸、低級アルキル、又は標準アミノ酸の側鎖である。)

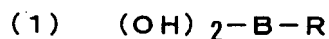
2. R が(4)である請求項1に記載の方法。

3. 原子1が S 又は O であり、残りの原子2-6が炭素である請求項2に記載の方法。

4. 化合物がベンゾ[b]フラン-2-ボロン酸又はベンゾ[b]チオフェン-2-ボロン酸である請求項3に記載の方法。

(5)

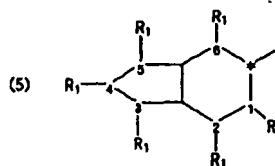
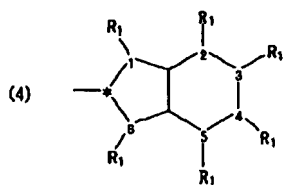
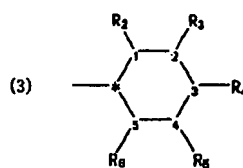
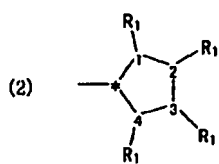
5. Rが(6)である請求項1に記載の方法。
6. 化合物がベンゾ[b]チオフェン-3-ボロン酸である請求項5に記載の方法。
7. Rが(11)である請求項1に記載の方法。
8. XがO又はNCH₃である請求項7に記載の方法。
9. Rが(2)である請求項1に記載の方法。
10. 原子1がSであると共に残りの原子2-4が炭素であるか、又は原子2がS又はOであると共に残りの原子1と3-4が炭素である請求項9に記載の方法。
11. 化合物がチオフェン-2-ボロン酸、3-ホルミルチオフェン-2-ボロン酸、5-クロロチオフェン-2-ボロン酸、4-メチルチオフェン-2-ボロン酸、5-アセチルチオフェン-2-ボロン酸、又はR-3-テトラヒドロフラニルボロン酸である請求項10に記載の方法。
12. Rが(12)である請求項1に記載の方法。
13. 化合物が2-ヒドロキシ-5-(3-トリフルオロメチルフェニルアゾ)ベンゼンボロン酸又は2,4,6-トリス(5-(4-ブromoフェニルアゾ)-2-ヒドロキシフェニル)ボロキシンである請求項12に記載の方法。
14. Rが(3)である請求項1に記載の方法。
15. 化合物がm-ニトロフェニルボロン酸である請求項14に記載の方法。
16. ベータラクタム抗生物質がアモキシシリン又はセフトジジムである請求項1に記載の方法。
17. 有効量の式(1)を有する化合物又は薬剤として許容可能な前記化合物の塩を感染に罹患した動物に投与する工程から成る、細菌感染を治療するための方法。



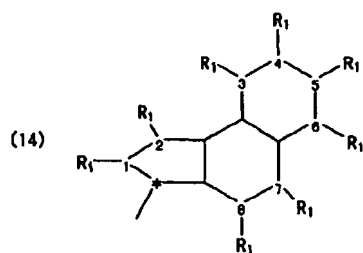
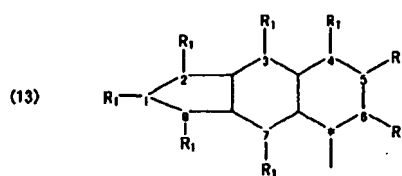
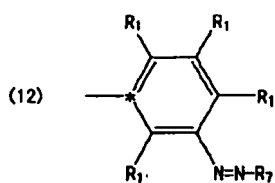
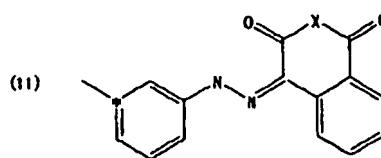
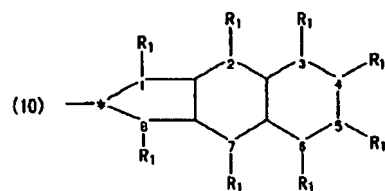
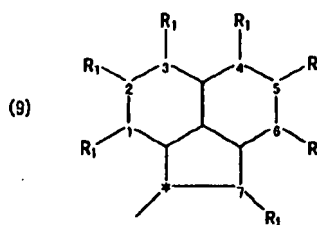
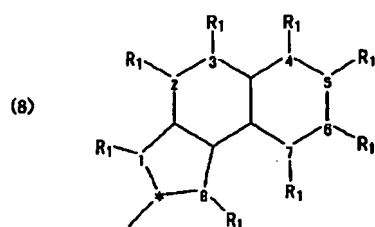
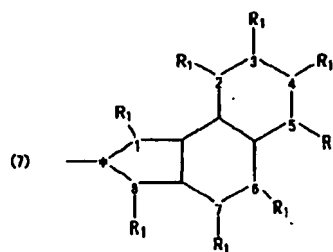
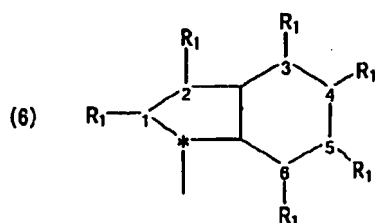
(ここで、

Rはナフタレン若しくはフェナントレンであるか、又は以下の式のうちの1つを有し、

(6)



(7)



ここで、

環の系(2)、(3)、(4)、(5)、(6)、(7)、(8)、(9)又は(10)は
芳香族又は非芳香族のどちらでもよく、

原子の中心*はキラル化合物の場合、(R)又は(S)であり、

(8)

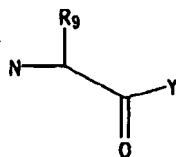
位置 1、2、3、4、5、6、7、又は 8 はそれぞれ独立的に C、N、O 又は S であり、

R_1 から R_6 はそれぞれ独立的に、孤立電子対、H、 $B(OH)_2$ 、ハロゲン原子、 CF_3 、 CH_2CF_3 、 CCl_3 、 CH_2CCl_3 、 CBr_3 、 CH_2CBr_3 、 NO_2 、低級アルキル、 CO_2H 、 $CHCHCOOH$ 、 $CH_2CH_2CH_2COOH$ 、 SO_3H 、 PO_3H 、 OSO_3H 、 OPO_3H 、OH、 NH_2 、 $CONH_2$ 、 $COCH_3$ 、 OCH_3 、又はフェニルボロン酸であるが、ただし、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_5 、及び R_6 は同時にすべて H であることはなく、 R_3 、 R_4 、 R_5 、及び R_6 が H であるときは R_2 は低級アルキルではなく、 R_2 、 R_4 、 R_5 、及び R_6 が H であるときは R_3 は NH_2 、OH 又は低級アルキルではなく、 R_2 、 R_3 、 R_5 、及び R_6 が H であるときは、 R_4 は低級アルキルではなく、

R_7 は孤立電子対、H、 $B(OH)_2$ 、ハロゲン原子、 CF_3 、 CCl_3 、 CBr_3 、 CH_2CF_3 、 CH_2CCl_3 、 CH_2CBr_3 、 NO_2 、 $CONH_2$ 、 $COCH_3$ 、 OCH_3 、低級アルキル、アリル、1 以上の置換基 R_8 で置換されたアリル、ヘテロアリル、又は 1 以上の置換基 R_8 で置換されたヘテロアリルであり、

R_8 はそれぞれ独立的に、孤立電子対、H、 $B(OH)_2$ 、ハロゲン原子、 CF_3 、 CCl_3 、 CBr_3 、 CH_2CF_3 、 CH_2CCl_3 、 CH_2CBr_3 、 NO_2 、低級アルキル、O、N、S、OH、 NH_2 、 $N(CH_3)_2$ 、 $N(CH_3)CH_2CH_3$ 、 $NCOCH_3$ 、 $COOH$ 、 $CHCHCOOH$ 、 $CH_2CH_2CH_2COOH$ 、 $CONH_2$ 、 $COCH_3$ 、 OCH_3 、 OCl 、又はフェニルボロン酸であり、

X は O、NH、 NCH_3 、又は



のいずれかであり、

Y は OH、 NH_2 、 NCH_3 、 $N(CH_3)_2$ 、 $NHCOCH_3$ 、又は $NHCOCH_2COOH$ であり、

(9)

R_gは、孤立電子対、H、B(OH)₂、ハロゲン原子、CF₃、CCl₃、CBr₃、CH₂CF₃、CH₂CCl₃、CH₂CBr₃、NO₂、CO₂H、CHCHCOOH、CH₂CH₂CH₂COOH、SO₃H、PO₃H、OSO₃H、OPO₃H、OH、NH₂、CONH₂、COCH₃、OCH₃、フェニルボロン酸、低級アルキル、又は標準アミノ酸の側鎖である。）

18. Rが(2)、(3)、(4)、(6)、(11)、又は(12)である請求項17に記載の方法。

19. 化合物が2-ヒドロキシ-5-(3-トリフルオロメチルフェニルアゾ)ベンゼンボロン酸、2,4,6-トリス(5-(4-ブロモフェニルアゾ)-2-ヒドロキシフェニル)ボロキシン、チオフェン-2-ボロン酸、3-ホルミルチオフェン-2-ボロン酸、5-クロロチオフェン-2-ボロン酸、4-メチルチオフェン-2-ボロン酸、5-アセチルチオフェン-2-ボロン酸、R-3-テトラヒドロフラニルボロン酸、又はベンゾ[b]フラン-2-ボロン酸、ベンゾ[b]チオフェン-2-ボロン酸、ベンゾ[b]チオフェン-3-ボロン酸、4-(3-ボロン酸フェニルアゾ)無水ホモフタル酸、又は4-(3-ボロン酸アゾ)ホモフタル酸イミドである請求項18に記載の方法。

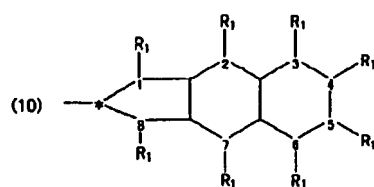
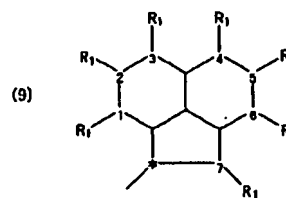
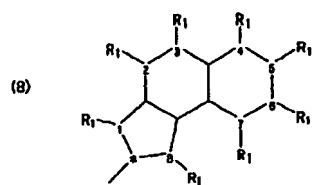
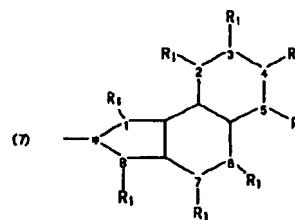
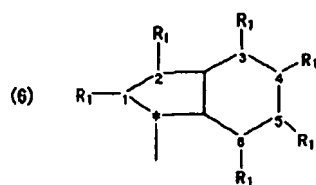
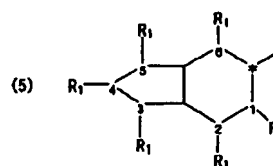
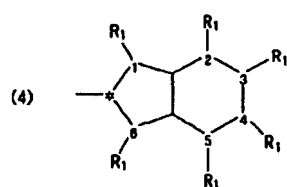
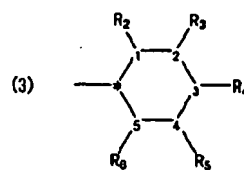
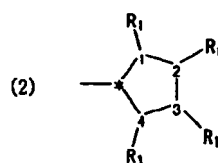
20. ベータラクタマーゼを有効量の式(1)を有する化合物と接触させる工程から成るベータラクタマーゼの阻害方法。



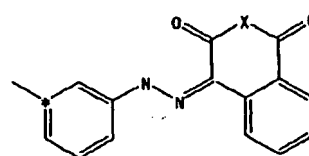
(ここで、

Rはナフタレン若しくはフェナントレンであるか、又は以下の式のうちの1つを有し、

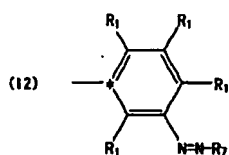
(10)



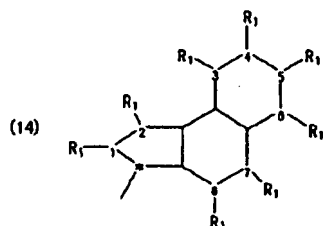
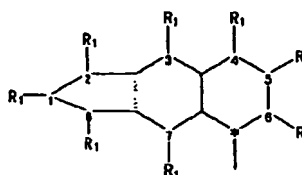
(11)



(11)



(13)



ここで

環の系(2)、(3)、(4)、(5)、(6)、(7)、(8)、(9)又は(10)は芳香族又は非芳香族のどちらでもよく、

原子の中心*はキラル化合物の場合、(R)又は(S)であり、

位置1、2、3、4、5、6、7、又は8はそれぞれ独立的にC、N、O又はSであり、

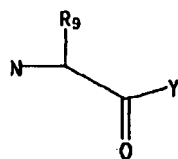
R₁からR₆はそれぞれ独立的に、孤立電子対、H、B(OH)₂、ハロゲン原子、CF₃、CH₂CF₃、CCl₃、CH₂CCl₃、CBr₃、CH₂CBr₃、NO₂、低級アルキル、CO₂H、CHCHCOOH、CH₂CH₂CH₂COOH、SO₃H、PO₃H、OSO₃H、OPO₃H、OH、NH₂、CONH₂、COCH₃、OCH₃、又はフェニルボロン酸であるが、ただし、R₂、R₃、R₄、R₅、及びR₆は同時にすべてHであることはなく、R₃、R₄、R₅、及びR₆がHであるときはR₂は低級アルキルではなく、R₂、R₄、R₅、及びR₆がHであるときはR₃はNH₂、OH又は低級アルキルではなく、R₂、R₃、R₅、及びR₆がHであるときは、R₄は低級アルキルではなく、

R₇は孤立電子対、H、B(OH)₂、ハロゲン原子、CF₃、CCl₃、CBr₃、CH₂CF₃、CH₂CCl₃、CH₂CBr₃、NO₂、CONH₂、COCH₃、OCH₃、低級アルキル、アリル、1以上の置換基R₈で置換されたアリル、ヘテロアリル、又は1以上の置換基R₈で置換されたヘテロアリルであり、

(12)

R_gはそれぞれ独立的に、孤立電子対、H、B(OH)₂、ハロゲン原子、CF₃、CCl₃、CBr₃、CH₂CF₃、CH₂CCl₃、CH₂CBr₃、NO₂、低級アルキル、O、N、S、OH、NH₂、N(CH₃)₂、N(CH₃)CH₂CH₃、NCOCH₃、COOH、CHCHCOOH、CH₂CH₂CH₂COOH、CONH₂、COCH₃、OCH₃、OCI、又はフェニルボロン酸であり、

XはO、NH、NCH₃、又は



のいずれかであり、

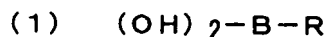
YはOH、NH₂、NCH₃、N(CH₃)₂、NHCOCH₃、又はNHCOCH₂COOHであり、

R_gは、孤立電子対、H、B(OH)₂、ハロゲン原子、CF₃、CCl₃、CBr₃、CH₂CF₃、CH₂CCl₃、CH₂CBr₃、NO₂、CO₂H、CHCHCOOH、CH₂CH₂CH₂COOH、SO₃H、PO₃H、OSO₃H、OPO₃H、OH、NH₂、CONH₂、COCH₃、OCH₃、フェニルボロン酸、低級アルキル、又は標準アミノ酸の側鎖である。)

21. ベータラクタマーゼが細菌によって生産されると共に、前記細菌を前記化合物又はその塩と接触させる請求項20に記載の方法。

22. 前記接触がインビトロで起こる請求項20に記載の方法。

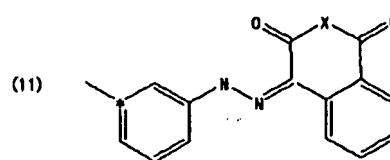
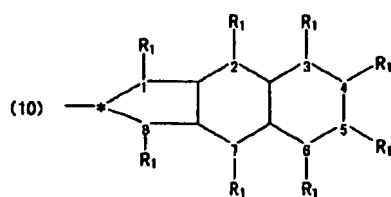
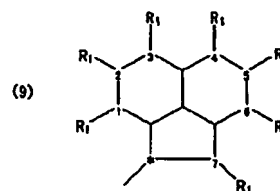
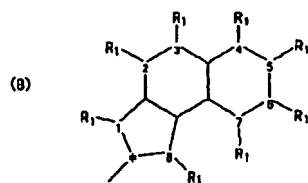
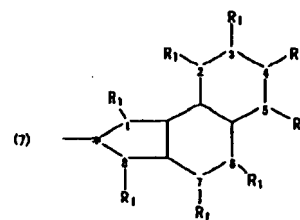
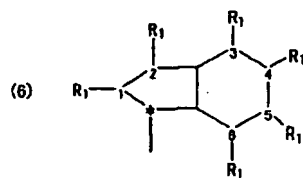
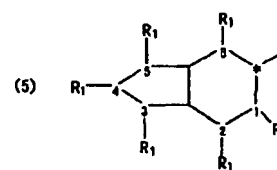
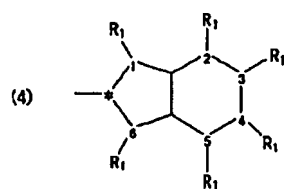
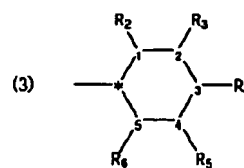
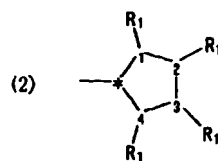
23. 式(1)を有する化合物を含有する薬剤組成物。



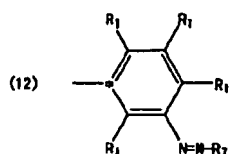
(ここで、

Rはナフタレン若しくはフェナントレンであるか、又は以下の式のうちの1つを有し、

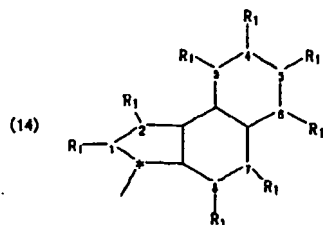
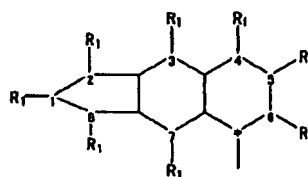
(13)



(14)



(13)



ここで、

環の系(2)、(3)、(4)、(5)、(6)、(7)、(8)、(9)又は(10)は芳香族又は非芳香族のどちらでもよく、

原子の中心*はキラル化合物の場合、(R)又は(S)であり、

位置1、2、3、4、5、6、7、又は8はそれぞれ独立的にC、N、O又はSであり、

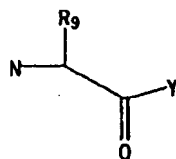
R₁からR₆はそれぞれ独立的に、孤立電子対、H、B(OH)₂、ハロゲン原子、CF₃、CH₂CF₃、CCl₃、CH₂CCl₃、CBr₃、CH₂CBr₃、NO₂、低級アルキル、CO₂H、CHCHCOOH、CH₂CH₂CH₂COOH、SO₃H、PO₃H、OSO₃H、OPO₃H、OH、NH₂、CONH₂、COCH₃、OCH₃、又はフェニルボロン酸であるが、ただし、R₂、R₃、R₄、R₅、及びR₆は同時にすべてHであることはなく、R₃、R₄、R₅、及びR₆がHであるときはR₂は低級アルキルではなく、R₂、R₄、R₅、及びR₆がHであるときはR₃はNH₂、OH又は低級アルキルではなく、R₂、R₃、R₅、及びR₆がHであるときは、R₄は低級アルキルではなく、

R₇は孤立電子対、H、B(OH)₂、ハロゲン原子、CF₃、CCl₃、CBr₃、CH₂CF₃、CH₂CCl₃、CH₂CBr₃、NO₂、CONH₂、COCH₃、OCH₃、低級アルキル、アリル、1以上の置換基R₈で置換されたアリル、ヘテロアリル、又は1以上の置換基R₈で置換されたヘテロアリルであり、

(15)

R₈はそれぞれ独立的に、孤立電子対、H、B(OH)₂、ハロゲン原子、CF₃、CCl₃、CBr₃、CH₂CF₃、CH₂CCl₃、CH₂CBr₃、NO₂、低級アルキル、O、N、S、OH、NH₂、N(CH₃)₂、N(CH₃)CH₂CH₃、NCOCH₃、COOH、CHCHCOOH、CH₂CH₂CH₂COOH、CONH₂、COCH₃、OCH₃、OCI、又はフェニルボロン酸であり、

XはO、NH、NCH₃、又は



のいずれかであり、

YはOH、NH₂、NCH₃、N(CH₃)₂、NHCOCH₃、又はNHCOCH₂COOHであり、

R₉は、孤立電子対、H、B(OH)₂、ハロゲン原子、CF₃、CCl₃、CBr₃、CH₂CF₃、CH₂CCl₃、CH₂CBr₃、NO₂、CO₂H、CHCHCOOH、CH₂CH₂CH₂COOH、SO₃H、PO₃H、OSO₃H、OPO₃H、OH、NH₂、CONH₂、COCH₃、OCH₃、フェニルボロン酸、低級アルキル、又は標準アミノ酸の側鎖である。))

24. Rが(4)である請求項23に記載の組成物。

25. 原子1がS又はOであり、残りの原子2-6が炭素である請求項24に記載の組成物。

26. 化合物はベンゾ[b]フラン-2-ボロン酸又はベンゾ[b]チオフェン-2-

ボロン酸である請求項25に記載の組成物。

27. Rが(6)である請求項23に記載の組成物。

28. 化合物がベンゾ[b]チオフェン-3-ボロン酸である請求項27に記載の組成物。

29. Rが(11)である請求項23に記載の組成物。

30. XがO又はNCH₃である請求項29に記載の組成物。

(16)

31. Rが(2)である請求項23に記載の組成物。

32. 原子1がSであると共に残りの原子2-4が炭素であるか、又は原子2がS又はOであると共に残りの原子1と3-4が炭素である請求項31に記載の組成物。

33. 化合物がチオフェン-2-ボロン酸、3-ホルミルチオフェン-2-ボロン酸、5-クロロチオフェン-2-ボロン酸、4-メチルチオフェン-2-ボロン酸、5-アセチルチオフェン-2-ボロン酸、又はR-3-テトラヒドロフラニルボロン酸である請求項32に記載の組成物。

34. Rが(12)である請求項23に記載の組成物。

35. 化合物が2-ヒドロキシ-5-(3-トリフルオロメチルフェニルアゾ)ベンゼンボロン酸又は2,4,6-トリス(5-(4-ブロモフェニルアゾ)-2-ヒドロキシフェニル)ボロキシンである請求項34に記載の組成物。

36. Rが(3)である請求項23に記載の組成物。

37. 化合物がm-ニトロフェニルボロン酸である請求項36に記載の組成物。

38. ベータラクタム抗生物質を更に含有する請求項23に記載の組成物。

39. ベータラクタム抗生物質がアモキシシリン又はセフトジジムである請求項38に記載の組成物。

(17)

【発明の詳細な説明】

ベータラクタマーゼ阻害剤及びその使用方法

背景

細菌が抗生物質に対して耐性を持つと、医療上の破局が近づいて来ていることが危惧される[ノイ (Neu)、Science、第257巻、1064-1073ページ、1992年]。

この問題は、進化における選択性や遺伝的形質転換により緊急課題となってきた。大部分の抗生物質薬は天然に生じる殺菌薬の誘導体であり[デーヴィス (Davies)、Science、第264巻、375-382ページ、1994年]、耐性のメカニズムについての多くはずっと昔に考え出された。人間による抗生物質の利用によって、このようなメカニズムが詳細に論じられると共に、遺伝子の転移を通じて広まってきた。ある種の細菌種に起因する耐性のメカニズムは生物圏じゅうに広まると予想され得る。

ベータラクタム薬（例えばアモキシシリン、セファロチン、クラバン酸塩、アズトレオナム）に対する細菌の適応は、最も研究された、最も悪性の抗生物質耐性の形式である。ベータラクタムは細菌に特有でそれ故選択性が高い酵素を標的とする。ベータラクタムは広く処方されている。耐性がない場合は、ベータラクタムは78の一般的な細菌感染のうちの45の感染治療に最初に選択される薬である[Godman&Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics(ハードマンら、編、ニューヨーク州、マグローヒル(Hardman et al., eds., MacGraw-Hill, New York, 1996))。これらの薬に対する耐性が進むと、抗生物質による治療にかかる費用が増大すると共にその効果が減小し、罹患率や死亡率の上昇につながる。

ベータラクタム系抗生物質は細菌の細胞壁の生合成を阻害する[トマース (Tomasz)、Rev. Infect. Dis.、第8巻、S270-S273、1986年]。この薬は、ペ

ニシリン結合タンパク質 (PBPs) と呼ばれるトランスペプチダーゼ/カルボキシペプチダーゼのグループと、共有結合による複合体を形成する。PBPIによる不活性化により細胞壁の生合成が妨げられ、細菌の自己分解及び死につながる。

細菌はベータラクタム薬を回避するためにいくつかの異なるメカニズムを利用

(18)

する[サンダーズ(Sanders)、Clinical Infectious Disease、第14巻、1089-1099ページ、1992年；リーら(Li et al.)、Antimicrob. Agents Chemother.、第39巻、1948-1953ページ、1995年]。おそらく最も広く利用されているのは、ベータラクタマーゼによるベータラクタムの加水分解であろう。

TEM-1及びAmpCはエシエリヒア コリ (*Escherichia coli*, *E. coli*) 由来の2つのベータラクタマーゼである。*E. coli*はそれ自身本来に重要な病原体である。*E. coli*はヒトのグラム陰性細菌感染の最も一般的な原因となっており[レヴィン(Levine)、New Engl. J. Med.、313巻445-447、1985年]、最も流行する院内感染源である[ソーンズベリー(Thornsberry)、Pharmacotherapy、第15巻、S3-8、1995年]。TEM-1を保有するか又はAmpCの生産の抑制が解除された*E. coli*はベータラクタム処理に対して耐性である。1992年現在で、米国の地域社会より単離された*E. coli*のうち30%、米国の病院より得られた*E. coli*のうち40-50%にも及ぶ*E. coli*がアモキシシリンを初めとするベータラクタムに耐性を有していた[ノイ(Neu)、Science、第257巻、1064-1073ページ、1992年]。これらの耐性*E. coli*のうちの多くは、クラブラン酸やスルバクタムのようなベータラクタマーゼ阻害剤に耐性である。

TEM-1及びAmpCはプラスミドに備えられたベータラクタマーゼ及び染色体ベータラクタマーゼの主な形式であり、広範な宿主における耐性の原因である。他の細菌種におけるTEM-1及びAmpC[ガレーニら(Galleni, et al.)、Biochem. J.、第250巻、753-760ページ、1988年]では、*E. coli*のTEM-1及びAmpCと配列

の高い相同性が共有されている。TEM-1は構造的にも触媒作用的にもスタフィロコッカス アウレウス (*Staphylococcus aureus*) のクラスAベータラクタマーゼに類似する。シトロバクター フロインディ (*Citrobacter freundlii*) 及びエントロバクター クロアカ (*Enterobacter cloacae*) のAmpCの構造が決定されているが、これらは*E. coli*の同酵素の構造に非常によく似ている[ケイ アシャー(K. Usher)、エル ブラツクザック(L. Blanszczak)、ビー ケー ショイシェット(B. K. Shoichet)、ジェイ アール レミントン(J. R. Remington)、出版準備中、1996年]。

(19)

ベータラクタマーゼの作用を克服するために、医薬品の化学者はクラブラン酸塩を初めとするベータラクタマーゼを阻害する化合物か、又はアズトレオナムを初めとするベータラクタマーゼによる加水分解を受けにくい化合物を導入した。どちらも抗生物質による治療には広く使用されており[ロリンソン(Rolinson)、Rev. Infect. Diseases、第13巻、S727-732、1991年]、どちらもベータラクタム薬である。これらは保護又は置換用に作用するという薬剤に対する類似性を有していたので、細菌は自身の耐性を維持しながら更に進化した。

これらの新しいクラスのベータラクタムに対する耐性は、以前はうまく働いていたメカニズムの変更によって生じる。ベータラクタマーゼの部分置換により、同酵素を回避すべく形成された化合物を、酵素が加水分解することができる[フィリップソンら(Philippon et al.)、Antimicrob. Agents Chemother.、第33巻、1131-1136ページ、1989年]。また、置換物によっては、酵素に対するベータラクタム阻害剤の親和性が減小したり[セイブズら(Saves, et al)、J. Biol. Chem.、第270巻、18240-18245ページ、1995年]、酵素が単純にそれらの阻害剤を加水分解するのを可能にしたりする。Staph. aureusのようないくつかのグラム陽性細菌は、細胞の環境内のベータラクタムを検出するセンサータンパク質を獲得した[ベネット、ショプラ(Bennet and Chopra)、Antimicrob. Agents Chemotherapy

第37巻、153-158ページ、1993年]。これらのセンサータンパク質へのベータラクタムの結合により、ベータラクタマーゼの転写をアップレギュレーションする。このように、ベータラクタマーゼのベータラクタム阻害剤は、自身を破壊しつつ、阻害を目的とした酵素の生産を誘導することができる。

細菌に対するヒトの治療による攻撃が天然にとられる経路に類似することは注目される。土壌細菌種及び菌種の中には、おそらくは他の細菌に対する武器として(これには議論の余地が残っているが)、ベータラクタムを生成するものもある。進化の間、影響を受ける細菌は、防御手段の中でも特にベータラクタマーゼを用いて、ベータラクタムに応答する。代わって、土壌細菌も、ベータラクタマーゼによる加水分解に耐性を有するベータラクタムを生成するか、又はベータラクタマーゼを阻害するベータラクタムを生成する。ストレプトマイセス クラバ

(20)

リゲリス (*Streptomyces clavuligeris*) は、TEM-1のようなクラスAベータラクタマーゼの阻害剤として臨床に使用されるクラブラン酸を含め、数種のベータラクタムを形成する。クロモバクテリウム バイオレイセウム (*Chromobacterium violaceum*) は、多くのベータラクタマーゼによる加水分解に抵抗性を有するモノバクタムとして临床上使用されるアズトレオナムを形成する。細菌が、ベータラクタムや実に多くのクラスの抗生物質に対する、「新しい」耐性のメカニズムに迅速に応答可能である理由の1つは、メカニズムが実際は新しくないということである。ベータラクタマーゼを克服するための新しいベータラクタム分子に医療化学的に焦点を当てる限り、耐性は短時間で起こることが予想できる。この論理は、鉛の薬やそれに対する耐性のメカニズムが、それらをヒトが治療用に使用するずっと前に生物圏に生じたからには、任意の抗生物質のファミリーに対して有効であろう。これには、アミノグリコシド、クロラムフェニコール、テトラサイクリン、及びバンコマイシンが含まれる。

この古くからの「軍備拡大競争 (arms race)」を繰り返すのを避けるための方

法の1つは、ベータラクタムとは異なる新規な化学的性質を有する阻害剤を創り出すことであろう。この非ベータラクタム阻害剤は、それ自身ベータラクタマーゼによって分解されず、同酵素の変異により加水分解を受けやすくなってはならない。新規な阻害剤は、ベータラクタマーゼの転写をアップレギュレートするベータラクタムセンサータンパク質による検出を回避し、ベータラクタムがPBP_sへ接近するのを制限するポーリンの変異による影響を受けない。このような阻害剤により、現在のベータラクタム薬は、ベータラクタマーゼが優力な耐性メカニズムを提供しているところで、細菌に抗して作用可能である。

ホウ酸及び特定のフェニルボロン酸が特定のベータラクタマーゼの阻害剤であるということが以前に報告された。キーナー、ウェイリー (Kiener and Waley)、*Biochem. J.*、第169巻、197-204ページ、1978年[ホウ酸、フェニルボロン酸 (2FD B) 及び*m*-アミノフェニルボロン酸塩 (MAPB) について]、ビーズレイら (Beesley et al.)、*Biochem. J.*、第209巻、229-233ページ、1983年[2-ホルミルフェニルボロン酸塩 (2FORMB)、4-ホルミルフェニルボロン酸塩 (4FORMB)、4-メチルフェニ

(21)

ルポロン酸塩 (4MEPB) を含めた 12 種類のフェニルポロン酸置換体について]、アミコサンテら (Amicosante et al.)、J. Chemotherapy、第 1 巻、394-398 ページ、1989 年 [ホウ酸、2FDB、MAPB、及びデトラフェニルポロン酸について] を参照されたい。より最近、*m*- (ダンシルアミドフェニル) -ポロン酸 (NSULFB) がエンテロバクター クロアカ P99 ベータラクタマーゼのマイクロモル以下の阻害剤となることが報告された。ドウリジャンスキ、プラット (Dryjanski and Pratt)、Biochemistry、第 34 巻、3561-3568 ページ、1995 年) を参照されたい。さらに、ストリナッカ (Strynadka) とその同僚は、変異させた TEM-1 酵素-ペニシリン G 複合体の結晶構造を用いて、同酵素に対して高い親和性を有する新規なアルキルポロン酸の阻害剤 [(1R)-1-アセトアミド-2-(カルボキシフェニル) エタンポロン酸] を形成した。ストリナッカら (Strynadka et al.)、Nat. Struc. Biol.、第 3 巻、688-695 ページ、1996 年を参照されたい。

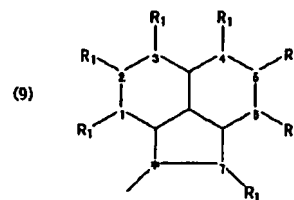
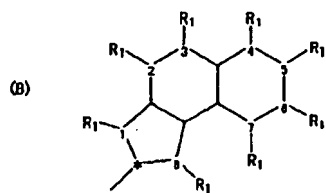
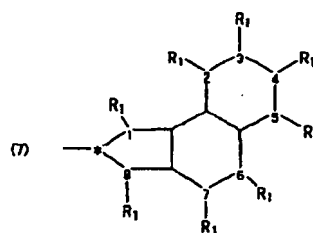
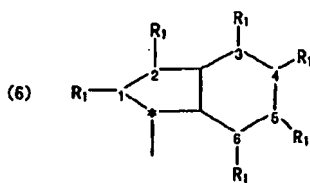
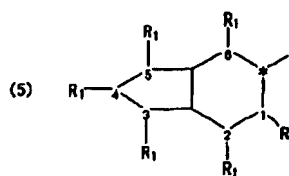
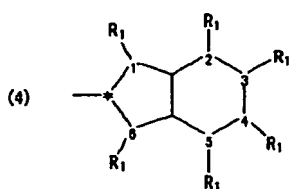
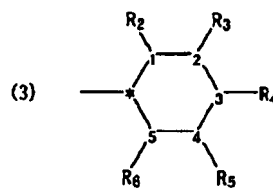
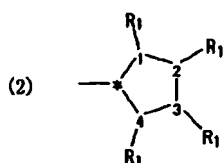
発明の概要

本発明はベータラクタマーゼの非ベータラクタム阻害剤を提供する。特に、本発明は以下の式を有するベータラクタマーゼ阻害剤を提供する。

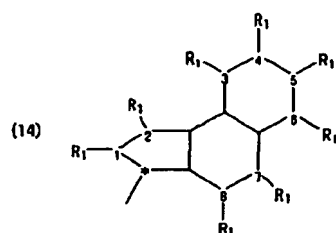
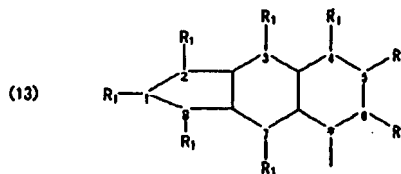
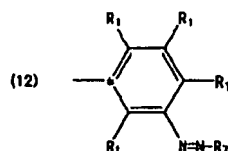
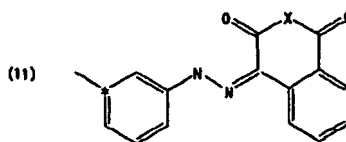
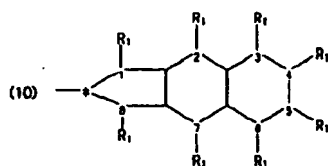


ここで、R はナフタレン、フェナントレンであるか、又は以下の式のうちの 1 つを有する。

(22)



(23)



ここで、

環の系統(2)、(3)、(4)、(5)、(6)、(7)、(8)、(9)又は(10)は芳香族又は非芳香族のどちらでもよく、

原子の中心*はキラル化合物の場合、(R)又は(S)であり、

位置1、2、3、4、5、6、7、8はそれぞれ独立的にC、N、O又はSである。

R₁からR₆はそれぞれ独立的に、孤立電子対、H、B(OH)₂、ハロゲン原子、CF₃、CH₂CF₃、CCl₃、CH₂CCl₃、CBr₃、CH₂CBr₃、NO₂、低級アルキル、CO₂H、CHCHCOOH、CH₂CH₂CH₂COOH、SO₃H、PO₃H、OSO₃H、OPO₃H、OH、NH₂、CONH₂、COCH₃、OCH₃、又はフェニルボロン酸である。ただし、R₂、R₃、R₄、R₅、及びR₆は同時にすべてHであることはなく、R₃、R₄、R₅、及びR₆がHであ

るときはR₂は低級アルキルではなく、R₂、R₄、R₅、及びR₆がHであるときはR₃はNH₂、OH又は低級アルキルではなく、R₂、R₃、R₅、及びR₆がHで

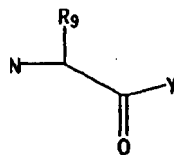
(24)

あるときは、 R_4 は低級アルキルではない。

R_7 は孤立電子対、 H 、 $B(OH)_2$ 、ハロゲン原子、 CF_3 、 CCl_3 、 $CB r_3$ 、 CH_2CF_3 、 CH_2CCl_3 、 $CH_2CB r_3$ 、 NO_2 、 $CONH_2$ 、 $COCH_3$ 、 OCH_3 、低級アルキル、アリル、1以上の置換基 R_8 で置換されたアリル、ヘテロアリル、又は1以上の置換基 R_8 で置換されたヘテロアリルであり、

R_8 はそれぞれ独立的に、孤立電子対、 H 、 $B(OH)_2$ 、ハロゲン原子、 CF_3 、 CCl_3 、 $CB r_3$ 、 CH_2CF_3 、 CH_2CCl_3 、 $CH_2CB r_3$ 、 NO_2 、低級アルキル、 O 、 N 、 S 、 OH 、 NH_2 、 $N(CH_3)_2$ 、 $N(CH_3)CH_2CH_3$ 、 $NCOCH_3$ 、 $COOH$ 、 $CHCHCOOH$ 、 $CH_2CH_2CH_2COOH$ 、 $CONH_2$ 、 $COCH_3$ 、 OCH_3 、 OCl 、又はフェニルボロン酸である。

X は O 、 NH 、 NCH_3 、又は



Y は OH 、 NH_2 、 NCH_3 、 $N(CH_3)_2$ 、 $NHCOCH_3$ 、又は $NHCOC H_2COOH$ であり、

R_9 は、孤立電子対、 H 、 $B(OH)_2$ 、ハロゲン原子、 CF_3 、 CCl_3 、 $CB r_3$ 、 CH_2CF_3 、 CH_2CCl_3 、 $CH_2CB r_3$ 、 NO_2 、 CO_2H 、 $CHCHCOOH$ 、 $CH_2CH_2CH_2COOH$ 、 SO_3H 、 PO_3H 、 OSO_3H 、 OPO_3H 、 OH 、 NH_2 、 $CONH_2$ 、 $COCH_3$ 、 OCH_3 、フェニルボロン酸、低級アルキル、又は標準アミノ酸の側鎖である。

本発明は、ベータラクタム抗生物質耐性の細菌の感染を治療する方法を提供する。この方法は、そのような感染を患っている動物に、有効量の式(1)のベータラクタマーゼ阻害剤又は薬剤として許容可能な該阻害剤の塩と、有効量のベータラクタム抗生物質とを投与する工程を含む。

式(1)の化合物及び薬剤として許容可能な該化合物の塩は、そのみで抗菌性を有することも見出されている。従って、本発明はさらに、感染を患っている

(25)

動物に、式(1)の化合物又は薬剤として許容可能な該化合物の塩の有効量を投与する工程を含む、細菌感染を治療する方法を提供する。

最後に、本発明は式(1)の化合物又は薬剤として許容可能な該化合物の塩と、薬剤として許容可能な担体とを含有する薬剤組成物を提供する。この薬剤組成物には、ペーラクタム抗生物質を含有してもよい。

図面の簡単な説明

図1 A-E ボロン酸の構造。図1 Aは、ペーラクタマーゼの阻害剤であることが以前に報告されたボロン酸である(従来技術)。図1 B及び2 CはペーラクタマーゼAmpC及びボロン酸阻害剤m-アミノフェニルボロン酸(MAPB)の複合体の結晶構造である。MAPBのm-アミノ基については明瞭さを期すために図示しないと共に、同じ理由により、AmpCの活性部位に隣接する大部分の残基の側鎖のみを示している。MAPBのフェニル環の位置は、「平面(上から見た)」図(図1 B)及び「背面(後方から見た)」図(図1 C)のどちらの図にも番号で示す。図1 D及び1 Eはペーラクタマーゼのボロン酸阻害剤であり、これには従来技術の阻害剤(*で印を付けている)及び本発明による阻害剤が含まれている。

図2 A-C Rが(4)である式(1)の化合物の合成を示す図である。

図3 Rが(12)である式(1)の化合物の合成を示す図である。

図4 A-B Rが(11)である式(1)の化合物の合成を示す図である。

図5 酵素の重要な活性部位残基を示す、ペーラクタマーゼ阻害剤ベンゾ[b]チオフェニル-2-ボロン酸(BZBTH2B)の周囲の環境を示す。

発明の現在好適な実施形態の詳細な説明

上記の式(1)において、以下の用語は以下の意味を有する。

「孤立電子対」とは、レセプター-リガンド(例えば酵素-阻害剤)複合体に関して重要な相互作用を行い得る非共有電子対(別の原子との実際の共有結合とは関連しない)のことを指す。

「アルキル」は1~25個の炭素原子を含む直鎖又は分岐鎖のアルキルを意味する。「低級アルキル」は1~4個の炭素原子を含む直鎖又は分岐鎖のアルキルを意味する。これらの用語はどちらも、R異性体とS異性体とを含む。

(26)

「アリル」は上記に定義されたように、1～3の芳香族環を含む構造を意味し、環の各々は5～6の炭素原子を含む。

「ヘテロアリル」は環に1以上のS、N又はO原子を含む蒸気中に定義されたアリルを意味する。

「標準アミノ酸」はアラニン、アルギニン、アスパラギン、アスパラギン酸、システイン、グルタミン酸、グルタミン、グリシン、ヒスチジン、ホモセリン、ヒドロキシプロリン、イソロイシン、ロイシン、リジン、メチオニン、ノルロイシン、ノルバリン、オルニチン、ベニシラミン、フェニルアラニン、フェニルグリシン、プロリン、ピログルタミン酸、セリン、トレオニン、トリプトファン、チロシン、及びバリンである。D-異性体、L-異性体のいずれを使用してもよい。

これらのアミノ酸の側鎖については公知であり、アミノ酸の側鎖の部分は、 $\text{NH}_2-\text{CH}-\text{COOH}$ 骨格に付けられている。例えば、アラニンの側鎖は CH_3 であり、アスパラギンの側鎖は CH_2CONH_2 である。

式(1)の中で最も好適な化合物は、Rが(4)の化合物である。特に好適なのは、(4)の原子1がS又はOの化合物であり、最も好ましくはSであり、残りの原子は炭素である。化合物のこのグループのうち、各 R_1 は好ましくはHであるか、又は各 R_1 はHである。ただし、番号3、4、及び6の原子に着いている R_1 については除く。原子6に付いた R_1 は好ましくは低級アルキルであり、原子3及び4に付いた R_1 は小さく極性を有し、水素結合を形成することが可能である。最も好ましくは、原子3に付いた R_1 は COOH 、 CHCHCOOH 、又は CONH_2 であり、原子4に付いた R_1 は NH_2 である。最も好適な化合物は、ベンゾ[b]フラン-2-ボロン酸及びベンゾ[b]チオフェン-2-ボロン酸である。

他の好適な式(1)の化合物は、Rが(6)の化合物である。特に好ましいのは、(6)の原子2がSで、残りの原子が炭素である化合物である。化合物のこのグループのうち、各 R_1 は好ましくはHである。最も好適な化合物は、ベンゾ[b]チオフェン-3-ボロン酸である。

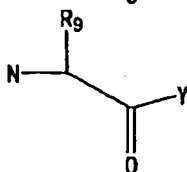
また、Rが(2)の式(1)の化合物も好ましい。Rが(2)である場合、原子1が好ましくはSであるか、原子2が好ましくはSかOである。最も好ましく

(27)

は、原子1がSであるか原子2がOである。特に好適な化合物は、チオフエン-2-ボロン酸、3-ホルミルチオフエン-2-ボロン酸、5-クロロチオフエン-2-ボロン酸、4-メチルチオフエン-2-ボロン酸、5-アセチルチオフエン-2-ボロン酸、及びR-3-テトラヒドロフランボロン酸である。

他の式(1)の好適な化合物は、Rが(11)の化合物である。Rが(11)

である場合、Xが好ましくは、O、NCH₃、又は



である。ここで、Yは好ましくはNH₂であり、R₉は好ましくは極性を有するが荷電していないアミノ酸(例えばセリン、トレオニン、アスパラギン及びグルタミン)である。最も好適なのは、4-(3-ボロン酸フェニルアゾ)無水ホモフタル酸及び4-(3-ボロン酸フェニルアゾ)-2-メチルホモフタル酸イミドである。

更に好適な式(1)の化合物には、Rが(3)のものであり、(3)の原子1~5が全て炭素であり、環がアリルである化合物が含まれる。好適な置換基R₂~R₆には、ハロゲン、1以上のハロゲン原子と置換された低級アルキル(例えばCF₃)、NO₂、CHCHCOOH、及びフェニルボロン酸が含まれる。より好適なのはフェニルボロン酸及びNO₂であり、最も好適なのはNO₂である。

式(1)の更なる好適な化合物には、Rが(12)のものも含まれる。好ましくは、R₁はOHである。好ましくはR₇はアリル又はヘテロアリルであり、1以上の置換基R₈で置換されていても置換されていなくてもよい。最も好適には、R₇は1以上の置換基R₈により置換されたフェニルである。最も好適なのは2-ヒドロキシ-5-(3-トリフルオロメチルフェニルアゾ)ベンゼンボロン酸及び2,4,6-トリリス(5-(4-ブロモフェニルアゾ)-2-ヒドロキシフェニル)ボロキシンである。

式(1)の化合物は市販のものを入手することもできるし、以下に述べるよう

(28)

に合成することもできる。該化合物の販売元には、ティーシーアイアメリカ社、オレゴン州ポートランド所在(TCI America, Portland, OR) ; キーオーガニクス社、イギリス・コーンウォール所在(Key Organics, Cornwall, UK) ; バイオネット社、イギリス・コーンウォール所在(Bionet, Cornwall, UK) ; フロンティアサイエンティフィック社、ユタ州ローガン所在(Frontier Scientific, Logan, UT) ; オールドリッチケミカル社、ウィスコンシン州ミルウォーキー所在(Aldrich Chemical, Milwaukee, WI) ; ランカスターシンセシス社、ニューハンプシャー州ウィンダム所在(Lancaster Synthesis, Windham, NH) が含まれる。

また、特に書き示していない限り、以下に述べる合成に使用する種々の化学薬品は、オールドリッチケミカル社、ウィスコンシン州ミルウォーキー所在(Aldrich Chemical, Milwaukee, WI)、ランカスターシンセシス社、ニューハンプシャー州ウィンダム所在(Lancaster Synthesis, Windham, NH)、ティーシーアイアメリカ社、オレゴン州ポートランド所在(TCI America, Portland, OR)、シグマケミカル社、ミズーリ州セントルイス所在(Sigma Chemical Co. St. Louis, MO)、アクロスオーガニクス社、ペンシルヴェニア州ピッツバーグ所在(Acros Organics, Pittsburgh, PA)、ケムサービス社、ペンシルヴェニア州ウェストチェスター所在(Chemservice Inc., West Chester, PA)、ビーディーエイチ社、カナダ・トロント所在(BDH Inc., Toronto, Canada)、フルーカケミカル社、ニューヨーク州ロンコンコマ所在(Fluka Chemical Corp., Ronkonkoma, NY)、プファルツ&バウアー社、コネチカット州ウォーターベリー所在(Pfaltz&Bauer, Inc., Waterbury, CT)、アボカドリサーチ社、イギリス・ランカシャー所在(Avocado Research, Lancashire, UK)、クレสเซントケミカル社、ニューヨーク州ハウページ所在(Crescent Chemical Co., Hauppauge, NY)、フィッシャーサイエンティフィック社、ペンシルヴェニア州ピッツバーグ所在(Fisher Scientific Co., Pittsburgh, PA)、フィゾンズケミカル社、イギリス・レスターシア所在(Fisons Chemicals, Leicestershire, UK)、アイシーエヌバイオメディカルズ社、カリフ

オルニア州コスタメーサ所在(ICN Biomedicals, Inc., Costa Mesa, CA)、ピアスケミカル社、イリノイ州ロックフォード所在(Pierce Chemical Co., Rockford,

(29)

IL)、リーデル・デ・ヘーン社、ドイツ・ハノーバー所在(Riedel de Haen AG, Hannover, Germany)、ワコーケミカルズユーエスエー社、バージニア州リッチモンド所在(Wako Chemicals USA, Inc., Richmond, VA)、メイブリッジケミカル社、イギリス・コーンウォール所在(Maybridge Chemical Co. Ltd., Cornwall, UK)、トランスワールドケミカルズ社、メリーランド州ロックヴィル所在(Trans World Chemicals, Inc., Rockville, MD)、アパインケミカルズ社、イギリス・ミルトンパーク所在(Apin Chemicals Ltd., Milton Park, UK)、及びパリッシュケミカル社、ユタ州オレム所在(Parish Chemical Co., Orem, UT)を含めた販売元から入手可能である。

Rが(2)~(10)、(13)及び(14)である式(1)の化合物は、ビーズレイら(Beesley et al.)、Biochem. J.、第209巻、229-233ページ、1983年又はマットソン(Matteson)、ACC. Chem. Res.、第21巻、294-300ページ、1988年に示すように合成可能である。また、Rが(4)である式(1)の化合物の合成方法を図解した図2A-Cを参照されたい。これらの図において、BuLiはブチリチウムである。R_x、R_y、R_zは、低級アルキル、シクロアルキル、又はフェニルのような任意の適切な脱離基である。R₁は上記に定義される。

Rが(12)である式(1)の化合物は、R₇-N=Oを開始化合物として用いて、図3に示すように合成される。ポリスチレン樹脂Pは、レッツノフ、ウォン(Leznoff and Wong)、Can. J. Chem. 第51巻、3755-3764ページ、1973年に述べられるように機能性が与えられ得る。また代わりに、機能性樹脂をノババイオケム社(Novabiochem.)から購入することもできる。図3の反応(b)はミルズ反応と呼ばれている。ミルズ反応における加水分解の選択性は温度によって決定され、温度は低く保たなければならない。氷酢酸はR₇がアリルである場合に

この工程に用いられる。しかしながら、酸性条件は、R₇の基に依存して当然変更され、他の溶媒や無機酸も使用される。マーチ(March)、Advanced Organic Chemistry、638ページ(第4版、1992年)(ジョン・ワイリー・アンドサンズ出版)及びThe Chemistry Of Nitro and Nitroso Groups) パート1、278-283ページ、1969年(インターサイエンス出版、ニューヨーク州所在、)を参照されたい。こ

(30)

の反応の変法が、アヤンガーら (Ayyangar et al.)、Tetrahedron Letters, 第30巻、7253ページ、1989年 (3-アミノフェニルボロン酸の代わりに3-N-アシルフェニルボロン酸から開始する) に述べられている。

最後に、図4A-Bは、Rが(11)である式(1)の化合物を合成する方法の図である。図4Aにおいて、反応は図4Aに示されるような遊離のボロン酸を用いて行われることが望ましい。しかしながら、図3に示すように、機能性樹脂を使用することができる。このような樹脂を使用すると、立体障害による副次的な反応が起こる危険性を減らすことができる。しかし、樹脂を使用する場合、第2の工程 (ジアソニウム塩を還元してヒドラジンにする工程) では、樹脂が開裂するであろう。いずれにせよ、ボロン酸は反応に酸性条件を提供する。図4Bにおいて、UはH、CH₃、又はR₉CH₂COYである。Rが(11)である式(1)の化合物は、キーオーガニクス社、イギリス・コーンウォール所在 (Key Organics, Cornwall, UK) から入手することも可能である (注文による合成)。

式(1)の化合物は、酸又は塩基の官能基を有してもよく、それゆえ、薬剤として許容可能な酸及び塩基と共に、薬剤として許容可能な塩を形成することができる。「薬剤として許容可能な塩」という言葉は、この場合、比較的毒性の低い、式(1)の化合物に無機及び有機の酸並びに塩基を付加した塩のことである。これらの塩は、精製した化合物を適当な酸又は塩基と反応させることによって調製可能である。適当な塩基には、薬剤として許容可能な金属カチオン若しくはアンモニアの、水酸化物、炭酸塩、若しくは重炭酸塩、又は薬剤として許容可能な有

機第1級アミン、第2級アミン若しくは第3級アミンが含まれる。典型的なアルキル金属又はアルキル土類金属には、リチウム、ナトリウム、カリウム、カルシウム、マグネシウム及びアルミニウム塩等が含まれる。塩基付加塩の形成に有効な典型的な有機アミンには、エチルアミン、ジエチルアミン、エチレンジアミン、エタノールアミン、ジエタノールアミン、ピペラジン等が含まれる。典型的な酸付加塩には、臭化水素酸塩、塩酸塩、硫酸塩、リン酸塩、硝酸塩、酢酸塩、吉草酸塩、オレイン酸塩、パルミチン酸塩、ステアリン酸塩、ラウリン酸塩、安息

(31)

香酸塩、乳酸塩、リン酸塩、トシラート(p-トルエンスルホン酸塩)、クエン酸塩、マレイン酸塩、フマル酸塩、コハク酸塩、酒石酸塩、ナフタル酸塩、メシラート(メタンスルホン酸塩)、グルコヘプトン酸塩、ラクトビオン酸塩、及びラウリル硫酸塩等が含まれる。

式(1)の化合物及び薬剤として許容可能な該化合物の塩は、ベータラクタマーゼの阻害剤である。背景の箇所で述べたように、ホウ酸及び特定のボロン酸が特定のベータラクタマーゼの阻害剤であることが以前報告された。これらの阻害剤は式(1)により定義される本発明の阻害剤とは異なっている。その上、式(1)の化合物の多くは、従来技術の阻害剤よりもはるかに有効なベータラクタマーゼ阻害剤である(以下の実施例を参照されたい)。

ベータラクタマーゼ活性を阻害するための検定が、当該技術分野において公知である。例えば、標準的な酵素阻害検定において、ある化合物のベータラクタマーゼ活性阻害能を使用することが可能である(例えば以下の実施例2や、エムジー ページ(M. G. Page)、Biochem J. 第295巻、(パート1)、295-304ページ、1993年を参照)。この検定に使用されるベータラクタマーゼは細菌源から精製してもよいが、組換えDNA技術によって精製されるとより好ましい。なぜならば、多くのベータラクタマーゼをコードする遺伝子及びcDNAクローンは公知であるからである。例えば、エス ジェイ カートライトとエス ジェイ ウェイリー

(S. J. Cartwright and S. G. Waley)、Biochem J.、第221巻、50, 5-512ページ、1984年を参照されたい。また、既知の細菌又は人為的に作成した細菌の、阻害剤に対してベータラクタマーゼを産生する感受性を決定することができる(以下の実施例3参照)。他の細菌阻害検定には、寒天ディスク拡散法や寒天希釈検定法がある。例えば、ダブリュー エイチ トラウブ、ビー レオンハルト(W. H. Traub & B. Leonhard)、Chemotherapy、第43巻、159-167ページ、1997年を参照されたい。阻害には、ベータラクタマーゼ活性の減小及び除去の両方が含まれる。

式(1)の化合物は、ポーリンが変異した結果としての、ベータラクタム抗生物質への細菌の耐性にも有効である(例えば以下の実施例5参照)。ポーリンの変異とは、細菌の細胞壁に存在するポーリンチャネルを形成するタンパク質の変異

(32)

である。このような変異により、ペーラクタム抗生物質が変異の起こった細菌細胞へ入る能力が損なわれ、それによってこれらの抗生物質に対する細菌の耐性が生じる。

(1) の化合物及び薬剤として許容可能な該化合物の塩は、ペーラクタム抗生物質耐性細菌感染の治療に使用可能である。「ペーラクタム構成物質耐性細菌感染」は、本明細書では、主としてペーラクタマーゼの作用、ポーリンの変異、又はそれらの両方が起こるためにペーラクタム抗生物質による治療に耐性を有する細菌によって引き起こされる感染のことを示す。ペーラクタム抗生物質に対する耐性は、標準的な抗生物質感受性試験によって決定することができる。ペーラクタマーゼ活性の存在は、当該技術分野において公知の方法で決定可能である(上記を参照)。ポーリンの変異の存在は、ポーリン遺伝子のポリメラーゼ連鎖反応分析と、細菌(ポーリンの変異を示唆する適当な分子量のタンパク質を欠いた細菌)に穏やかな浸透圧衝撃(例えばEDTAを含んだ低張液で処理した後、穏やかに遠心分離し、上清を分離する)を加えることによって得られた標品

のポリアクリルアミドゲル電気泳動とにより検出可能である。又は、バクテリオファージTu1Aによる感染に対する耐性の決定(これはOmpF⁻ポーリンの変異に対する標準的な試験である)によっても可能である。代わりに、また、好ましくは、式(1)の化合物又は薬剤として許容可能な該化合物の塩と、ペーラクタム抗生物質とを組合せたものに対する特定の細菌の感受性を標準的な抗生物質感受性試験法により決定することができる。

ペーラクタム耐性細菌感染を治療するためには、そのような感染に罹患している動物に、有効量の式(1)の化合物又は薬剤として許容可能な該化合物の塩と、有効量のペーラクタム抗生物質とを投与する。式(1)の化合物又は薬剤として許容可能な該化合物の塩と、抗生物質とは、別々に投与してもよいし、一緒に投与してもよい。一緒に投与する場合、それらは別々の薬剤組成物の中に含有されてもよいし、同じ薬剤組成物中に含有されてもよい。

多くの適当なペーラクタム抗生物質が一般に知られている。この抗生物質には、セファロスポリン(例、セファロチン)、ペニシリン(例、アモキシシリン)、

(33)

モノバクタム(例、アズトレオナム)、カルバペネム(例、イミペネム)、カルバセフェム(ロラカルベフ)等が含まれる。ベータラクタム抗生物質は(耐性が存在しない場合)、広範な細菌感染に対して有効である。その感染には、グラム陽性菌とグラム陰性菌との両方によって生じるものを含み、例えば、スタフィロコッカス属(例、スタフィロコッカス アウレウス (*Staphylococcus aureus*)、スタフィロコッカス エピダーミス (*Staphylococcus epidermis*))、ストレプトコッカス属(例、ストレプトコッカス アガラクチン (*Streptococcus agalactine*))、ストレプトコッカス ニューモニア (*Streptococcus pneumoniae*)、ストレプトコッカス フェカリス (*Streptococcus faecalis*))、ミクロコッカス属(例、ミクロコッカス ルテウス (*Micrococcus luteus*))、バチルス属(例、バチルス ズブチリス (*Bacillus subtilis*))、リステリア属(例、リステリア モノサイト

ジェネス (*Listerella monocytogenes*))、エシエリヒア属(例、エシエリヒア コリ (*Escherichia coli*))、クレブシエラ属(例、クレブシエラ ニューモニア (*Klebsiella pneumoniae*))、プロテウス属(例、プロテウス ミラビリス (*Proteus mirabilis*))、プロテウス ブルガリス (*Proteus vulgaris*))、サルモネラ属(例、サルモネラ タイフォサ (*Salmonella typhosa*))、赤痢菌属(例、シゲラ ソネイ (*Shigella sonnei*))、エンテロバクター属(例、エンテロバクター エアロジェン (*Enterobacter aerogene*))、エンテロバクター ファシウム (*Enterobacter faecium*))、セラチア属(例、セラチア マーセスセンス (*Serratia marcescens*))、シュードモナス属(例、シュードモナス イルジノサ (*Pseudomonas aeruginosa*))、アシネトバクター属(例、アシネトバクター アニトラタス (*Acinetobacter anitratus*))、ノカルジア属(例、ノカルジア オートトロフィカ (*Nocardia autotrophica*))、及びミコバクテリウム属(例、ミコバクテリウム フォーチュイタム (*Mycobacterium fortuitum*))が含まれる。ベータラクタム抗生物質の有効な投与濃度及び様式については当該技術分野において公知であるか、又は式(1)の化合物に対しては以下に述べるように経験的に決定することができる。

式(1)の化合物又は薬剤として許容可能な該化合物の塩は単独で抗菌性を有するが、ベータラクタム抗生物質よりも高い濃度で抗菌性を示す。実際、それら

(34)

は、ペーラクタム抗生物質耐性細菌に対する活性を示した。特定の理論に縛られることは望んでいないが、この抗菌活性は阻害剤がペーラクタマーゼに類似のPBPsと結合するために生じると考えられている。PBPsはペーラクタム抗生物質感受性のすべての細菌種に見出されるので、式(1)の化合物又は薬剤として許容可能な該化合物の塩は、ペーラクタム抗生物質(上記参照)と同様に、同じ細菌に対して有効であることが期待される。ペーラクタム抗生物質に関して同様に、式(1)の化合物又は薬剤として許容可能な該化合物の塩に対する細菌の感受性は、標準的な抗生物質感受性試験によって決定することができる。

ペーラクタム抗生物質耐性細菌感染を初めとする細菌感染に罹患している動物を治療するために、有効量の式(1)の化合物又は薬剤として許容可能な該化合物の塩を、単独で又はペーラクタム抗生物質と組合せて該動物に投与する。式(1)の化合物の有効な投薬の形式、投与方法、及び投薬量は、経験的に決定されるが、そのような決定を行うことは当該技術分野の範囲内にある。投薬量が、使用した特定の化合物の活性、細菌感染の程度、細菌感染がペーラクタム抗生物質による治療に対して耐性であるかどうか、投与経路、化合物の排出率、治療の持続時間、その動物に投与されている任意の他の薬の存在、年齢、動物の大きさ及び種、並びに医薬業界及び獣医薬業界で公知の類似の要因によって、変異するということは、当業者には理解されることである。一般に、適切な1日投薬量は、治療の効果を生じるのに有効な最小量である。全1日投薬量は、安全な医療上の判断の範囲内で、付き添いの医師又は獣医師により決定される。望ましい場合、式(1)の化合物又は薬剤として許容可能な該化合物の塩の有効な1日量は、2、3、4、5、6回、又はそれより回数の多い下位の(サブの)投薬として投与し、一日にわたって、適切な間隔を開けて、別々に投与する。ペーラクタム抗生物質耐性細菌感染を初めとする細菌感染の治療には、本発明によれば、感染の除去と同様に、感染の緩和も含まれる。

本発明により治療可能な動物には、哺乳類が含まれる。本発明により治療可能な動物には、イヌ、ネコ、他の家畜、及びヒトが含まれる。

式(1)の化合物又は薬剤として許容可能な該化合物の塩を治療用に動物に投

(35)

与するには、経口、鼻腔、直腸、膣内、腸管外、及び大漕内への投与、並びに、粉末、軟膏、又は滴剤としての局所的（頬及び舌下を含む）な投与を含めた任意の適切な投与経路によることができる。好適な投与経路は経口及び腸管外である。

活性成分（１以上の式（１）の化合物又は薬剤として許容可能な該化合物の塩

であって、それら単独であっても、ペーラクタム抗生物質と組み合わせてもよい）を、そのみで投与することも可能ではあるが、活性成分は調合薬（組成物）として投与することが望ましい。本発明の薬剤組成物には、１以上の薬剤として許容可能な他の担体と、及び任意に、１以上の他の化合物、薬、又は他の物質と混合した活性成分が含まれる。各担体は、調合薬の他の成分と融和性を有し、患者に有害ではないという意味で、「許容可能な」ものでなければならない。

本発明の調合薬には、経口、鼻、局所（頬及び舌下を含む）、直腸、膣、及び／又は腸管外投与に適した調合薬が含まれる。選択した投与経路に関係なく、活性成分は当業者には周知の従来の方法により、薬剤として許容可能な投薬形式に処方される。

担体物質と組み合わせる１回量の形式を調製するための活性成分の量は、治療される宿主、特定の投与方法、及び上述に述べた他のすべての要因によって変化する。担体物質と組み合わせる１回量の形式を調製するための活性成分の量は、一般に、治療の効果を生じるのに有効な最小量である。

調合薬すなわち薬剤組成物を調製する方法には、活性成分を担体及び任意に１以上の補助的な成分と混合する工程が含まれる。一般に、調合薬は、活性成分を液体担体及び細分した固体担体の少なくともいずれか一つと均一かつ完全に混合させてから、必要であれば製品の形を定めることにより、調製される。

経口投与に適した本発明の調合薬は、カプセル、カシェ剤、丸剤、錠剤、トローチ剤（通常、スクロースとアラビアゴム又はトラガカントゴムのようなフレーバー成分を使用する）、粉末剤、顆粒剤の形で、又は水性又は非水性の液体より形成した溶液又は懸濁液として、水中油滴型又は油中水滴型の液体懸濁液として、エリキシル剤又はシロップとして、錠剤（Pastilles、ゼラチンとグリセリン

(36)

スクロースとアラビアゴムのような、不活性なベースを使用する)として、及び口内洗浄剤やそれと同様なものとしての形式のうち、少なくともいずれか1つの形である。これらは各々、所定量の活性成分を含有する。また、活性成分は、巨丸剤、糖菓剤、又はペーストとして投与してもよい。

経口投与に関する本発明の固体の投薬形式(カプセル、錠剤、丸剤、糖衣錠、粉末剤、顆粒剤等)において、活性成分はクエン酸ナトリウムやリン酸ニカルシウムを初めとする1以上の薬剤として許容可能な担体と、以下の物質の中の任意のものとのうち、少なくともいずれか1つと混合される。その物質とは、(1)デンプン、ラクトース、スクロース、グルコース、マンニトール、及び/又はケイ酸のような充填剤又は増量剤、(2)例えばカルボキシメチルセルロース、アルギン酸塩、ゼラチン、ポリビニルピロリドン、スクロース及び/又はアラビアゴムのような接着剤、(3)グリセロールのような湿潤剤、(4)寒天、炭化カルシウム、ジャガイモ又はタピオカのデンプン、アルギン酸、特定のケイ酸塩、及び炭酸ナトリウムのような分解剤、(5)パラフィンのような溶解遅延剤、(6)第四アンモニウム化合物のような吸収促進剤、(7)セチルアルコール、モノステアリン酸グリセロールのような湿潤剤、(8)カオリン、ベントナイト土のような吸収剤、(9)滑石、ステアリン酸カルシウム、ステアリン酸マグネシウム、固体のポリエチレングリコール、固体のラウリル硫酸塩、及びそれらの混合物のような潤滑剤、(10)着色剤である。カプセル、錠剤、及び丸剤の場合、薬剤組成物には緩衝剤も含み得る。同様な種類の固体組成物を、ラクトース即ち乳糖と同様、高分子量のポリエチレングリコール等の賦形剤を用いて、軟らかく及び硬く充填されるゼラチンカプセルの充填剤とすることもできる。

錠剤は、任意に1以上の補助的な成分を用いて、圧縮又は成形によって形成することができる。圧縮錠剤は、結合剤(例えばゼラチン、又はヒドロキシプロピルメチルセルロース)、潤滑剤、不活性な希釈剤、保存料、錠剤分解剤(デンプ

ングリコール酸ナトリウム又は架橋したカルボキシメチルセルロースナトリウム

(37)

)、界面活性剤又は分散剤を用いて調製可能である。成形錠剤は、不活性な液体希釈剤で湿らせた粉末の活性成分の混合物を、適当な機械で成形することにより形成可能である。

錠剤と、糖衣錠、カプセル、丸剤、及び顆粒剤のような本発明の薬剤組成物の固体の投薬形式とを、任意にコーティングやシェルを用いて調製可能である。該コーティングには、腸溶コーティングや調剤の分野においてよく知られている他のコーティングがある。また、錠剤や他の本発明の薬剤組成物の固体の投薬形式は、その中に存在する活性成分の放出を遅延又は制御できるように調剤してもよく、それには例えば、所望の放出プロファイルが得られるようにヒドロキシプロピルメチルセルロースを割合を変化させて用いたり、他のポリマーマトリクス、リポソーム、及び／又はミクロスフェアを用いたりする。錠剤や他の本発明の薬剤組成物の固体の投薬形式は、例えば、細菌を保持するフィルターに通して濾過することによって滅菌可能である。これらの組成物には、任意に不透明化剤を含有してもよく、組成物を、胃腸管の特定の部分においてのみ又は好ましくは胃腸管の特定の部分において、遅延した方法（任意）で活性物質を放出するような組成物に形成してもよい。使用可能な包埋組成物の例には、ポリマー物質やワックスが含まれる。活性成分はマイクロカプセルに入れた形式であってもよい。

活性成分の経口投与に関する液体の投薬形式には、薬剤として許容可能なエマルジョン、マイクロエマルジョン、溶液、懸濁液、シロップ、及びエリキシル剤が含まれる。活性成分に加えて、液体の投薬形式には、当該技術分野においてよく使用される例えば水又は他の溶媒、エチルアルコール、イソプロピルアルコール、エチルカーボネート、エチルアセテート、ベンジルアルコール、ベンジルベンゾエート、プロピレングリコール、1,3-ブチレングリコール、油（特に綿実油、落花生油、コーン油、胚芽油、オリーブ油、ヒマシ油、ゴマ油）、グリセロール、

テトラヒドロフリルアルコール、ポリエチレングリコール及びソルビタンの脂肪酸エステル、及びそれらの混合物のような安定剤並びに乳化剤のような不活性な希釈剤が含まれる。

(38)

不活性な希釈剤の他に、経口用組成物には、湿潤剤、入荷及び懸濁剤、甘味料、調味料、着色剤、香料及び保存料のような補助剤が含まれ得る。

懸濁液には、活性成分に加えてエトキシ化イソステアリルアルコール、ポリオキシエチレンソルビトール、ソルビタンエステル、微晶質セルロース、メタ水酸化アルミニウム、ベントナイト、寒天及びトラガカントゴム、並びにこれらの混合物のような、懸濁用の試薬を含有してもよい。

直腸又は膣に投与するための本発明の薬剤組成物の調剤は座薬として与え得る。該座薬は、活性成分を例えばココア脂、ポリエチレングリコール、座薬用ワックス、又はサリチル酸塩を含む、1以上の刺激の起こらない適当な賦形剤又は担体と混合することによって調製することができ、室温では固体であるが体温では液体となるため、直腸又は膣内で溶けて活性成分を放出する。膣への投与に適した本発明の調合薬には、当該技術分野において適当であるとして知られている担体を含有する膣座薬、タンポン、クリーム、ゲル、ペースト、フォーム、又はスプレー調合物も含まれる。

活性成分の局所的投与又は経皮的投与に対する投薬形式には、粉末、スプレー、軟膏、ペースト、クリーム、ローション、溶液、貼り薬、及び吸入薬が含まれる。活性成分は、滅菌条件下において、薬剤として許容可能な担体及び任意の緩衝剤と、又は必要な推進剤と混合可能である。

軟膏、ペースト、クリーム及びゲルには、活性成分以外に、動物や植物の油脂

オイル、ワックス、パラフィン、スターチ、トラガカントガム、セルロース誘導体、ポリエチレングリコール、シリコン、ベントナイト、ケイ酸、酸化滑石及び亜鉛、又はそれらの混合物のような賦形剤を含んでもよい。

粉末及びスプレーには、活性成分以外に、ラクトース、タルク、ケイ酸、水酸化アルミニウム、ケイ酸カルシウム及びポリアミド粉末、又はそれらの物質の混合物のような賦形剤を含み得る。スプレーには、更に、クロロフルオロ炭化水素やブタン及びプロパンを初めとする揮発性の非置換炭化水素のような通例の推進剤を含み得る。

(39)

経皮的な貼り薬は、体内への活性成分の輸送を制御できるという更なる利点を有する。このような投薬形式は、活性成分をエラストマーマトリクスのような適当な媒質に溶解するか、分散するか、そうでなければ組み込むことによって、形成することができる。吸収促進剤を使用して、皮膚への活性成分の流れを増加させることも可能である。このような流れの速度は、速度調節膜を設けるか、ポリマーマトリクス又はゲルに活性成分を分散するかのいずれかによって制御可能である。

腸管外投与に適した本発明の薬剤組成物には、1以上の薬剤として許容可能な滅菌等張水溶液若しくは非水溶液、分散媒、懸濁液若しくはエマルジョン、又は使用直前に滅菌された注射可能溶液若しくは分散媒へと再構成可能な滅菌粉末と組み合わせた活性成分が含まれると共に、抗酸化剤、緩衝剤、調合薬をレシピエントの血液と等張にするための溶質、又は濃縮剤が含まれ得る。

本発明の薬剤組成物に関して使用可能な適当な水溶性担体及び非水溶性担体の例には、水、エタノール、ポリオール(グリセロール、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール等)、それらの適当な混合物、オリーブ油を初めとする

植物油、及びオレイン酸エチルのような注射可能な有機エステルが挙げられる。適当な流動性を、例えば、レシチンのようなコーティング剤を使用したり、分散の更に必要な粒子の大きさを維持したり、界面活性剤を使用することによって維持することができる。

このような組成物には、湿潤剤、乳化剤、及び分散剤のような補助剤も含み得る。糖、塩化ナトリウム等のような等張剤を組成物中に含むことも望ましい。更には、モノステアリン酸アルミニウムやゼラチンのような吸収を遅らせる薬剤を含有することによって、注射可能な形式の薬剤の吸収の遅延を生じさせることも可能である。

場合によっては、活性成分の効果を延長するために、皮下注射又は筋肉注射の薬剤の吸収を遅らせることが望ましい。これは、水への溶解性が小さい結晶性材料又は無定型材料の液体懸濁液を使用することによって達成し得る。活性成分の吸収速度は、その溶解速度に依存し、溶解速度は又、結晶の大きさ及び形に依存

(40)

する。また、腸管外に投与した活性成分の吸収の遅延は、活性成分を油の賦形剤に溶解又は懸濁させることによって達成される。

注射可能な形式のデポー（貯留）剤は、ポリラクチド-ポリグリコシドを初めとする生分解性ポリマーによって活性成分のマイクロカプセルマトリクスを形成することにより形成される。活性成分のポリマーに対する比率及び使用される特定のポリマーの性質に応じて、活性成分の放出速度は制御可能である。他の生分解性ポリマーの例には、ポリ（オルトエステル）及びポリ（無水物）が含まれる。注射可能なデポー剤の調合薬は、体組織に対して適合性を有するリポソーム又はマイクロエマルジョン中に活性成分を閉じこめることによって調製可能である。注射可能な物質は、例えば、細菌を保持するフィルターに通して濾過することによって滅菌可能である。

この調合薬は、例えばアンプルやバイアルのような単位投与量又は複数回投与量の密封容器に入れて提供することができ、使用直前に、注射できるよう例えば見ずのような滅菌液体担体を加えるだけで済むような、凍結乾燥した状態で保存可能である。即席の注射溶液及び懸濁液を、上述の種類である滅菌粉末、顆粒、及び錠剤から調製することができる。

本発明の薬剤組成物は獣医学の調合薬としても使用することができ、それには、（１）例えば餌に混合する浸薬（水溶性又は非水溶性の溶液若しくは懸濁液）、錠剤、大きい丸薬、粉末、顆粒又はペレットか、舌へ塗布するペーストのような経口投与、

（２）滅菌した溶液又は懸濁液として皮下、筋肉内、又は静脈に注射したり、適当な場合は、懸濁液又は溶液が乳首を通して動物の乳房に注入される場合には乳房内注射する等の腸管外投与、

（３）皮膚に塗布されるクリーム、軟膏、又はスプレーとしての局所的適用、

（４）例えば膣座薬、クリーム、フォームとしての腔内投与、
に適した調合薬が含まれる。

実施例

実施例 1 : 潜在的なベータラクタマーゼ阻害剤の同定

(41)

新規の阻害剤が結合すると思われるE. coliのTEM-1及びAmpCベータラクタマーゼの部位を狙い定めるため、特定の酵素-阻害剤複合体の構造を決定した。これらの構造及び酵素-阻害剤複合体及び酵素-基質複合体の他の既知の構造を、酵素の結合部位を決定するために使用した。コンピュータ操作による方法を用いてAmpCに関する更なる潜在的な結合部位についても同定した。

TEM-1及びAmpCを選んだのは、上述したように、これらの2つのベータラクタマーゼがE. coliのベータラクタム抗生物質に対する耐性の原因になっており、他の細菌種におけるTEM及びAmpCがE. coliのTEM及びAmpCと高い配列の相同性を共有していると共に構造的に類似しているからである。TEM及びAmpCベータラクタマーゼの種間の類似性が高いということは、E. coliの同酵素に対して発見された阻害剤が、他の細菌種のタイプI及びタイプIIベータラクタマーゼに対して活性であろうことを示唆する。このことは以下に示した抗菌性のデータと一致している。以下のデータは、本発明のボロン酸誘導体が数種の異なるタイプI及びタイプIIのTEM-1ベータラクタマーゼ（例えばエンテロバクタークロアカに発現するAmpC様酵素）を発現している細菌に対して活性であることを示す。

AmpCを、本来のAmpC遺伝子を減小させるか又は完全に除去したE. coliのJM109細胞（ラリー ブラツクザック (Larry Blanszczak)、イーライリリー社、インディアナ州インディアナポリス所在 (Eli Lilly and Co., Indianapolis, Indiana) より供与) において発現させた。この酵素をコードするDNAを温度感受性リプレッサの制御下でプラスミドに配置した。このプラスミドを有する細胞を2リットルのLB肉汁で発酵槽において対数期まで生育した。次に、酵素の発現を温度衝撃によって誘導し、細胞を一晩培養した。上清をAffigel-10アミノフェニルボロン酸塩アフィニティカラム（パイオラド ラボラトリーズ社、1000 アルフレッド ノーベル ドライブ、カリフォルニア州ヘルクレス所在 (Bio-Rad Laboratories, 1000 Alfred Nobel Drive, Hercules, CA) にか、AmpCタンパク質を上清から精製した。サンプルの精製度はHPLCにより96%以上と推定された。生産された酵素の量は、280nmにおける吸光度に基づいて150mgと推定された。

(42)

この調製方法により得られたタンパク質を使用して、回折する性質を備えた結

晶を生長させた。3つのボロン酸塩-酵素複合体 (*m*-アミノフェニルボロン酸 (MAPB)、ベンゾ[b]チオフェン-2-ボロン酸 (BZBTH2B)、及び *m*-ニトロフェニルボロン酸 (3NPB)) の構造も決定した。タンパク質の結晶を、懸濁液滴下法を用いて蒸気を拡散することによって得た。滴中のタンパク質濃度は 3–6 mg/ml であり、ボロン酸阻害剤濃度は 1–10 mM であった。ウェル中の緩衝液は pH 8.7 の 1.7 M リン酸カリウムとした。MAPB-AmpC 複合体に関しては 2% メタンペンタジオールも使用した。MAPB-AmpC 複合体に関して、ショーン-ハムリン (Xuong-Hamlin) マルチワイヤ検出器に基づいて X 線回折データを収集した。BZBTH2B-AmpC 及び 3NPB-AmpC 複合体に関しては、R 軸イメージプレートシステムに基づいてデータを収集した。MAPB-AmpC 複合体の構造は、プログラム TNT (ディートロンラド (D. E. Tronrud)、Acta Crystallogr. Sect. A、第 48 巻、912–916 ページ、1992 年) により精密化した (refined)。BZBTH2B-AmpC 及び 3NPB-AmpC 複合体はプログラム X-Plor [ブランガー エー ティー (Brunger, A. T.)、S-PLOR Version 3.1A System For x-ray Crystallography And NMF、(エール大学出版、コネチカット州ニューヘーヴン所在 (Yale University Press, New Haven, CT、1992 年))] により精密化した。3 つすべてのボロン酸-AmpC 複合体の構造に対して、プログラム O [ジョーンズら (Jones et al.)、Acta Crystallogr. Sect. A、第 47 巻、110–119 ページ、1991 年] によりモデルを構築した。これら 3 つの複合体に関する X 線結晶学的統計を以下の表 1 に示す。3 つのボロン酸塩複合体の構造と、ノックス及びその同僚によるリン酸塩複合体の構造 [ロブコフスキーら (Lobkovsky, et al.)、Biochemistry、第 33 巻、6762–6772 ページ、1994 年] とを利用して、部分的に AmpC に関する結合部位を決定した。

TEM-1 に関しては、ナタリーストリナッカが決定した 3 つの阻害剤-酵素複合体の構造 [ストリナッカら (Strynadka et al.)、Nature、第 359 巻、700–705 ページ、1992 年、ストリナッカら (Strynadka et al.)、Nature Structural Biology、第 3 巻、233–239 ページ、1996 年、ストリナッカら (Strynadka et al.)、Nat. Struct.

(43)

Biol., 第3巻、688-695ページ、1996年] を用いてTEM-1の結合部位を決定した。3つの複合体は、ベータラクタマーゼ阻害タンパク質を含んだタンパク質-タンパク質の複合体、ペニシリンGとの複合体、及びボロン酸塩阻害剤との複合体であった。

クンツ [クンツら (Kuntz et al.), J. Mol. Biol., 第161巻、269-288ページ、1982年] 及びホーニヒ [ギルソンとホーニヒ (Gilson and Honig), Nature, 第330巻、84-86ページ、1987年] のコンピュータ操作による方法を用いて、様々な阻害剤が利用するわけではないが酵素の構造の中に存在すると思われる、AmpCのトンネル領域における更なる潜在的な結合部位を同定した。

上述のように決定した結合部位を利用して、他のボロン酸もベータラクタマーゼの潜在的な阻害剤であると同定した。2-フェニルボロン酸、MABP、チオフェン-2-ボロン酸 (TH2B)、3NPB、及び4,4'-ビフェニルニボロン酸 (BIPD) を、AmpC活性部位へのモデリングのための市販品として入手可能なボロン酸の典型例として選択した。シビル (Sybyl) の分子モデリングスイート [トロポス社 (Tropos Inc.), ミズーリ州セントルイス所在 (St. Louis, Mo)] を利用して、各化合物に対する構造及び配座のライブラリーを作成した。AmpCとの配座異性体の相互作用を、立体配置基準及び静電的基準に基づきDTSTMAP [ショイシェット ピー ケー (Shoichet, B. K.), ボディアン ディー エル (Bodian, D. L.), クンツ アイ ディー (Kuntz, I. D.), J. Comp. Chem. 第13巻、380-397ページ、1992年] 及びDelphi [ギノレソン エム ケイ (Gilson, M. K.), ホーニヒ ビー エイチ (Honig, B. H.), Nature, 第330巻、84-86ページ、1987年] のプログラムを用いて記録した (表1)。リガンドの配向性に関する2つの主なファミリーを同定した。第1の「MAPB様」モードでは、ボロン酸リガンドは、MAPB-AmpC構造における阻害剤と同様に配向し、Thr 316、Asn 346、及びAsn 289の残基と相互作用すると予想される。第2の「リン酸塩様」モードでは、ボロン酸リガンドは、ロブコフスキー

らにより決定されたAmpC-阻害剤構造 [ロブコフスキー イー (Lobkovsky, E.), ビリングズ イー エム (Billings, E. M.), モーズ ピー ジー (Moews, P. C.), ラヒル ジェイ (Rahil, J.), プラット アール エフ (Pratt, R. F.), ノックス

(44)

ジェイ アール(Knox, J. R.), Biochemistry, 第33巻、6762-6772ページ、1994年]におけるリン酸塩リガンドと同様に配向し、Asn 152及びGln 120残基と相互作用すると予想される。E. coliのAmpC残基を示すために使用される番号付けの計画はガレーニら(Galleni, et al.)によるものである。ガレーニら(Galleni, et al.), Sequence and Comparative Analysis of Three Enterobacter cloacae ampC β -Lactamase Genes and Their Products, Biochem. J., 第250巻、753-760ページ、1988年を参照されたい。

これらのモデリング研究からいくつかの予想が生じてきた。2つのモードにおける配向の分布は、一般に、ボロン酸リガンドの大きさと相関関係があり、リガンドが大きくなるほど「リン酸塩様」モードを指向するが、これは「MAPB様」モードではレセプターと立体的な衝突が起こるためである。TH2Bのようなリガンドは、「MAPB様」配座で結合する可能性があり、AmpCに関する有効性を改善し得るAmpC結合部位の特徴と特異的に相互作用するものと予想された。より大きなBZBT H2Bのようなリガンドは、「リン酸塩様」の幾何学的形態において結合するものと予想された。この後者の形態において、BZBTH2B及び3NPBのようなリガンドは、Gln 120、Asn 152、Tyr 150と相互作用するものと予想された。

AmpCと複合体を形成した際のBZBTH2B及び3NBPの幾何学的形態は、これらの予想と一致している。BZBTH2B ($2F_0 - 2F_c$ 電子密度)の構造を精密化することにより、セリン64 (Ser 64)と共有結合した阻害剤が示された。電子密度により、結合部位におけるこの化合物の配向が明確に決定された。結晶学的統計は良好であり(R-factor 0.179、R-free 0.229)、すべての結合及び角度の値は、十分精密化した構造に対して許容される偏差の範囲内に含まれた。3NPB ($2F_0 - 2$

F_c 電子密度)に関して同様な構造を精密化することにより、この阻害剤も同様にSer 64と共有結合することが示された。図5はBZBTH2B周囲の酵素環境の重要な活性部位残基を示す。示された残基は、Arg 349及びAsp 346を除いては、概してBZBTH2Bの5オングストローム以内にあった。にもかかわらず、これらの2つの残基は、明確に描かれた2つの水分子(小さな球)を通じてBZBTH2BのO2水酸基と相互作用する極性ネットワークの一部である。点線は水素結合の相互作用

(45)

を示し、原子は互いに2.6-3.2オングストロームの範囲内にある。これらのX線構造の原子解像の性質により、阻害剤がAmpCと形成している相互作用であって、更なる同酵素に関するボロン酸阻害剤を同定かつ設計するための強い骨組を提供する相互作用がはっきりと示された。

表 1

阻害剤 複合体	解像 範囲	データ completeness	R- merge	R-factor R-free (%)	空間群セル大きさ (オングストローム; 度)
BZBTH2B	20-2.25	87%	9.4	17.9, 22.4	C2; a=119, b=78, c=99 $\alpha=\gamma=90^\circ$; $\beta=116^\circ$
3NPB	20-2.15	95%	8.4	22, 25	C2; a=121, b=78, c=99 $\alpha=\gamma=90^\circ$; $\beta=117^\circ$
MAPB	20-2.3	95%	8.8	19.5, 未知	C2; a=119, b=77, c=98 $\alpha=\gamma=90.0^\circ$; $\beta=117^\circ$

構造モデリングの後、酵素活性及び抗菌活性の阻害試験を行った。その後、更なる化合物のモデリングと試験を行った。試験の結果に関しては、実施例2-5を参照されたい。構造モデリング、酵素試験、及び抗菌性評価というサイクルにより以下の観察が導かれた。

MAPB-AmpC複合体の興味をそそる特徴は、阻害剤のアリル基と酵素との間に、明らかに好ましい相互作用がいかに観察されないかということである。にもかかわらず、MAPBはAmpCに対して $7.3 \pm 0.9 \mu\text{M}$ の K_i 値を有する。MAPBの親和性に対して可能な説明の一つは、化合物の結合がリガンドの疎水性に左右されるということである。これについて試験するため、数種の他の疎水性ボロン酸の

阻害について測定した。1-ナフチル及び9-フェナントレン-ボロン酸はMAPBよりも解離定数が2-3倍劣った(高かった)。これらのリガンドはMAPBよりも大きいいため、疎水性の影響が立体的な制約によって複雑になっている可能性がある。2-ナフチルボロン酸はMAPBに匹敵する親和性($K_i = 8.5 \pm 1.8 \mu\text{M}$)を有し、正確な配向において大きな疎水性置換基が存在することによって結合が阻害されるわけではないことが示唆された。当然ながら、測定可能なAmpCの阻害能を有さないジフェニルボロン酸については、モデリング結果により、残基Tyr 150及びLys 67残基との立体衝突が起こり得ることが示唆される。他方、より小

(46)

くて可撓性のあるn-ブチルボロン酸では、AmpC部位へ適合するのに困難さはほとんど伴わないであろうが、n-ブチルボロン酸も又、測定可能なAmpCの阻害能を有さない。総括すると、これらの結果は、ボロン酸が官能基の正確な立体化学的配置を有していなければならない、疎水性のみでは親和性を説明するには不十分であるということを示唆している。

AmpCに対するボロン酸の親和性が異なるのは、アリル環上の置換基による親電子物質としてボロン酸の原子団が活性化されるためかもしれない。2-ホルミルフェニルボロン酸及び4-ホルミルフェニルボロン酸の親和性と、3-トリフルオロフェニルボロン酸及び4-トリフルオロフェニルボロン酸の親和性とを比較した。親和性が主として、ボロン酸の原子団の親電子物質に関する効果により制御される場合、2位及び4位に存在する電子吸引基は、ほぼ等しい活性体であるが、どちらも3位に存在する類似の基よりも良好な活性体であると予想されるであろう。代わりに、3位に存在する誘導体は4位に存在する誘導体よりも活性が大きく、2位に存在する基は3位や4位に存在する誘導体よりは活性がずっと小さいことが見出された。これは、MAPBの2位周囲の立体的な束縛と、3位周囲の「MAPB様」配向における極性環境とに一致する。3-テトラヒドロフラニルボロン酸の(S)及び(R)の立体異性体は、大きさの順でAmpCに対する親和性が異なることも見出された。この事実は、酵素との非共有的な相互作用でしか説明できず、

おそらくリガンドが「MAPB様」結合モードを採用する場合、Thr 316残基付近と相互作用するのであろう。

MAPBの全体的な立体配置を維持する一方で機能性は変化する摂動について次に考えた。「MAPB様」結合モードの場合、Asn 289、Asn 346、及びArg 349の水素結合基がMAPB様化合物の3位、及び4位の潜在的な環置換体に近接して存在する。また、ボロン酸リガンドが「リン酸塩様」配向で結合する場合、Gln 120及びAsn 152の水素結合基が付近に存在する。ボロン酸に基づくリガンドモデリング(酵素の融通性、リガンドの静電的性質の単純化モデル等については斜酌されない)に使用される多くの近似によれば、この結果は、ガイドとしてしか使用できないことに留意すべきである。どちらの結合モードの場合でも、これ

(47)

らの付近の残基との（あるいは少なくとも極性の補足を提供する）水素結合に関連する可能性があるリガンドの機能性について探求することは道理に合ったことであるように思われる。これらの構造的な考察と一致して、フェニルボロン酸の3-ニトロ及び3-トリフルオロ誘導体の K_i 値は、1～2マイクロモルの範囲にあり、これはMAPBよりも4～5倍良好であった。しかしながら、フェニルボロン酸の3-カルボキシ誘導体はAmpCに対して有意な親和性を示さない($K_i > 100 \mu M$)。これより示唆されるのは、該化合物は、阻害剤のm-置換体と該酵素のArg 349残基との間の相互作用を可能にする方法でAmpCと結合することはできないということである。

該酵素の3つの領域は特に重要性を有した。ボロン酸に基づくリガンドに関して「MAPB様」結合モードをとる場合、「峡谷(canyon)」が、結晶複合体中のMAPB環の3位付近に示された。更に、長さ約15オングストロームの大きな親水性トンネルが結晶複合体のMAPBの4位付近に示され、それは酵素の表面を通して広がっていた。また、モデリングの結果によって示唆されるように、潜在的なボロン酸リガンドが「リン酸塩」結合配向をも採用する場合、Ala 318、Tyr 221、

Gln 120、及びAsn 152残基によって決定されるポケットにより、リガンドの機能性の変化による標的部位とのリガンド相互作用が増大するという可能性が与えられる。

驚くべきは、4,4'-ビフェニルニボロン酸の類似体がAmpCを強力に阻害するということであり、 K_i は $0.18 \pm 0.02 \mu M$ である。この誘導体は、以前に示されたAmpCのトンネル領域の開口部付近に適合するようにモデル化されるが、酵素の一部に收容されなければそのようになることはない。酵素の緩和がない状態でMAPBと同じ結合モデルを採用するとすれば、阻害剤はSer 287、Asp 288、Asn 289、及びAsn 346と密接に接触するだろう。モデリング結果によれば他の立体配座も可能であることが示唆されるかもしれないが、それら他の立体配座はいずれも、この化合物の親和性を明確に説明できる相互作用を形成しない。最も保守的な説明は、4,4'-ビフェニルニボロン酸類似体がMAPB-E. coli複合体により示唆される原子団の全体的配置を保持するというものである。これにより、

(48)

Ala292を初めとする残基を含めて、トンネル領域の開口部との相互作用が起こる。しかしながら、それを実現するためには、Asn346及びSer287残基をリガンドからわずかに移動させて離す必要がある。

結晶複合体のMAPBの環原子団に対して、Tyr150及びThr316の水素基が近接していることにより、2位又は3位の極性原子又は分極可能な原子が、MAPBのフェニル環よりもむしろ酵素を補足していることが示唆される。この見解と一致して、チオフェン-2-ボロン酸はAmpCに対して $2.5 \pm 0.4 \mu\text{M}$ の K_i 値を有し、(R)-3-テトラヒドロフラニルボロン酸は $1.4 \pm 0.1 \mu\text{M}$ の K_i 値を有することが見出された。チオフェン-3-ボロン酸は、「MAPB様」結合配向においてTyr150からの水素結合を受け入れることができないのであるが、AmpCに対する親和性がずっと劣っている($K_i = 22.1 \pm 3.5 \mu\text{M}$)。(S)-3-テトラヒドロフラニルボロン酸は、そのヘテロ原子は「MAPB様」結合配向においてThr3

16と相互作用することができないのであるが、 $15.8 \pm 0.8 \mu\text{M}$ の K_i 値を有する。他方、2-フラニルボロン酸の親和性が低いのは($K_i \gg 100$)、この化合物は2-チオフェン誘導体と同様に、Tyr150の水素結合を受け入れることができるので、単に水素結合の考察に基づいて説明することは困難である。2-フラニル誘導体に対する2-チオフェン誘導体の活性の相違は、もしかすると、アリル基の酸素に対するアリル基の硫黄の極性及び分極性のわずかな差を反映しているのかもしれない。また別に、活性の相違は、分子の形状の相違を反映しているのかもしれない。

大きなヘテロアリル基の存在も含めて、置換体ではTH2Bの有効性が改善されるという可能性についても考慮した。モデリングによって示唆されたのは、ベンゾ[b]ヘテロアリルボロン酸のような大きな系を含んだリガンドは、おそらくAmpC部位に「MAPB様」結合モード（配向の分布に基づき、酵素の一部への収容は存在しないと仮定する）では適合しないが、それらのリガンド化合物は依然として他の有利な配向で酵素と結合可能ということである。TH2Bの数種の誘導体を試験すると、最も強力な誘導体はベンゾ[b]チオフェン-2-ボロン酸であった。この化合物のAmpCに対する K_i 値は、 27 nM である。

(49)

ベンゾ[b]チオフェン-2-ボロン酸はチオフェン-2-ボロン酸よりも約200倍活性が大きく、これは、第2のアリル環の相互作用が親和性にかなり寄与していることを示唆している。この推論は、ベンゾ[b]フラン-2-ボロン酸の活性がフラン-2-ボロン酸よりも約1000倍大きいことにより支持される。同時に、BZBTH2Bの活性を2-ナフチルボロン酸 ($K_i = 8.5 \pm 1.8 \mu\text{M}$) (これは末端のアリル環がベンゾ[b]チオフェン誘導体とほぼ同じ部分に配置される) の活性と比較することにより、チオフェン環の重要性が確認された。モデルの構築により、BZBTH2Bが、Gln120、Asn152、及びTyr218残基によって形成されるポケットにおいてAmpCに結合し得ることが示唆された。

試験したボロン酸化合物に存在する多様な化学的機能性から、AmpC結合部位のマッピングを行ったところ、構造を変化させて試験した薬剤の有効性を改良できることが示唆された。これらの阻害剤のモデリングにより、以前の阻害剤クラスでは予期しなかった方法で、それらが酵素と相互作用できることが示唆された。同時に、このようなモデリングには曖昧さが若干あると共に、活性に対する構造の基礎に関する重要な問題については解決されないままであることを認めなければならない。

実施例2：ベータラクタマーゼの阻害剤に関する化合物の試験

分光測定検定 [ページ (Page)、Biochem J. 第295巻、295-304ページ、1993年を参照] を用いて、E. ColiのベータラクタマーゼであるTHM-1及びAmpCの阻害について試験を行った。AmpCは実施例1に述べたように調製した。TEM-1はアルバート大学 (カナダ、エドモントン所在) のナタリーストリナッカ氏より供与された。TEM-1は、代わりに、以下のようにして製造することもできる。TEM-1遺伝子をpALTER-EX2 (プロメガ社 (Promega)) HpaI部位に挿入してクローン形成する。該遺伝子はタンパク質の発現に関してオンになるT7プロモータの制御下に存在する。TEM-1は数種の他のE. Coli株だけでなく、JM109細胞でも発現可能である。細胞は対数期の後期まで生育した後、タンパク質の発現を誘導した。細胞を回転により落とし、酵素が輸出される上清を収集する。酵素は上清へと輸出されているため、マタグネら (Matagne et al.) Biochem J. 第265巻、131-146ページ、1990

(50)

年、エスコバル(Escobar et al.)、Biochemistry、第33巻、7619-7626ページ、1994年に述べられているように、標準的なカラムクロマトグラフィーを用いて精製することができる。

試験する各化合物の、1～100 mM濃度の最初のストック溶液をDMSO（ジメチルスルホキシド）を用いて調製した。溶解性及び吸収性のプロファイルを、2

5℃においてアッセイバッファー（50 mMリン酸緩衝溶液、pH 7.0）にDMSOストック溶液を少量ずつ増やして添加することより、マルチセルトランスポートランニングHPケムステーションソフトウェア（multi-cell transport running HP ChemStation software）バージョン2.5を搭載したHP8543紫外／可視分光光度計を用いて決定した。酵素試験は一般に、化合物の溶解性及び吸収性のプロファイルによって決定された濃度の上限から開始した。

AmpCに対する標準アッセイ条件は以下の通りである：pH 7.0、100 μ M セファロチンナトリウム塩（基質として）、265 nmにて反応をモニター、T = 25℃、50 mMリン酸バッファー、酵素と阻害剤とはインキュベーションしない、10～15秒のサイクル時間、全反応体積 = 1 mL、実行時間 = 5分、0.06 nM AmpCの追加により反応開始。このような条件下でのセファロチン加水分解のバックグラウンドの速度は、酵素に関するセファロチン加水分解の速度よりも2～3桁（セファロチンベータラクタム吸光度ピーク）小さかったため、基質のバックグラウンド加水分解に対する補正はしなかった。TEM-1に対して、100 μ M 6- β -フリルアクリロイルアミドペニシラン酸、トリエチルアンモニウム塩（FAP）を基質として使用し、反応を340 nm（FAPベータラクタムの吸光度ピーク）でモニターし、サイクル時間を25秒まで増加させた（この基質は幾分光感受性であるため）。FAPが光感受性であるため、この基質に対する加水分解のバックグラウンドの速度は最小であることが見出されたが、わずかではなかったため、FAPのバックグラウンドの速度を減じることにより、すべてのコントロール及び阻害された細胞の測定速度を補正した。TEM-1アッセイに対する他のすべての条件はAmpCアッセイに関する条件と同じとした。DMSOをどの場合も酵素コントロールに加えた。アッセイにおいて、標準1 mm経路長さの分光光度計用石英

(51)

セルを使用した。すべてのアッセイは、先に示したHP8543分光光度計で行った。

各反応の全時間経過に関する吸光度データを線形及び二次方程式に適合させたものを用いて、各分光光度計セルの反応速度を決定した。得られた反応速度の結果を用いて、ウェイリー (S. G. Waley)、Biochem J. 第205巻、631-633ページ、1982年の方法を利用して可能性のある阻害剤の各々に対する阻害定数を計算した。簡単に説明すると、この方法は、ミカエリス-メンテンの式を積分したものを用いて、阻害されていない酵素反応と阻害された酵素反応との比較から酵素阻害剤の K_i 値を算出することに関する。

α -キモトリプシン(ウシ膵臓)、 β -トリプシン(ウシ膵臓)、及びエラスターゼ(ブタ膵臓)に対する阻害剤の活性を検定することにより特異性試験を行った。 α -キモトリプシン(N-ベンゾイル-L-チロシンエチルエステル、BTEE)及び β -トリプシン(N-ベンゾイル-L-アルギニンエチルエステル、BAEE)に対する基質をシグマケミカル社、ミズーリ州セントルイス所在(Sigma Chemical Co. St. Louis, MO)より入手した。使用したエラスターゼ基質(エラスターゼ基質1、N α -メトキシスクシニル-Ala-Ala-Pro-Val-p-ニトロアニリド)は、カルバイオケム社、カリフォルニア州サンディエゴ所在(Calbiochem, San Diego, CA)より入手した。特異性試験に使用した酵素はすべて、シグマケミカル社、ミズーリ州セントルイス所在(Sigma Chemical Co. St. Louis, MO)より入手した。 α -キモトリプシンに関しては、1 mg/ml 酵素ストック溶液(50 mMリン酸バッファー、pH 7) 3 μ l を、試験するボロン酸塩と共に5分間インキュベートした。次に、DMSOストック溶液から630 μ M BTEEを添加して反応を開始した。反応は25 $^{\circ}$ Cで行い、260 nmでモニターした。 β -トリプシンに関しては、0.8 mg/ml 酵素ストック溶液(50 mMリン酸バッファー、pH 7) 40 μ l を、試験するボロン酸塩と共に5分間インキュベートした。次に、DMSOストック溶液から600 μ M BAEEを添加して反応を開始した。エラスターゼに関しては、1 mg/ml 酵素ストック溶液(50 mMリン酸バッファー、pH 7) 50 μ l を、試験するボロン酸塩と共に5分間インキュベートした。次に、DMSOストック溶

(52)

液から $64 \mu\text{M}$ のエラスターゼ基質を加えて反応を開始した。

試験を行った化合物を以下の表 2 A 及び 2 B に列挙している。特定の従来技術の化合物 (表 2 A では * で印を付けた) も比較のために試験した。9-フェナントレンボロン酸 (9PHNB) はティーシーアイアメリカ社、オレゴン州、ポートランド所在 (TCI America, Portland, OR) より入手した。ブチルボロン酸 (BUTB)、4-ブロモフェニルボロン酸 (4BPB)、3-ニトロフェニルボロン酸 (3NPB)、2-ヒドロキシ-5- (3- (トリフルオロメチル) フェニルアゾ) ベンセンボロン酸 (HFAB)、2,4,6-トリス- (4-ブロモフェニルアゾ) -2-ヒドロキシフェニル) ボロキシ (4BPAPB)、及びジエタノールアミン- (3R) - (+) -テトラヒドロフラニルボロン酸塩 (DETHFB) は、オールドリッチケミカル社、ウィスコンシン州ミルウォーキー所在 (Aldrich Chemical, Milwaukee, WI) より入手した (HFAB と 4BPAPB は稀少化合物に関するシグマオールドリッチライブラリー (Sigma Aldrich Library) の製品である)。試験した残りの化合物はランカスターシンセシス社、ニューハンプシャー州ウィンダム所在 (Lancaster Synthesis, Windham, NH) より入手した。化合物はすべて、更に精製や確認を行うことなく使用した。

試験の結果を以下の 2 A、2 B 及び 2 C に示す。表 2 A 及び 2 B には、AmpC 及び TEM-ベータラクタマーゼの阻害検定の結果を示し、表 2 C には特異性試験の結果を示す。表において、N.T. は試験を行っていないことを、N.A. は試験した最大の阻害剤濃度において活性がなかったことを示す。本実施例において説明していない表 2 A、2 B、及び 2 C に使用している他の略語については、図 1 A、1 D、1 E に説明している。

表 2 A

(53)

ボロン酸塩	Ki <i>E. coli</i> AmpC (μM)	Ki <i>E. coli</i> TEM-1 (μM)
<u>ボロン酸</u>		
DFB	>500	>>100
<u>非環式アルキルボロン酸</u>		
BUTB	>500	>100
<u>複素環式アルキルボロン酸</u>		
RDETHFB	1.1	27.0
SDETHFB	15.0	86.2
<u>アリルボロン酸塩</u>		
BIPD	0.6	>>100
HFAB	1.3	N.T
3TFMB	1.6	85.0
NSULFB*	1.6	88.0
3NPB	1.9	24.0
4BPB	2.6	31.3
4FORMB*	2.8	35.0
4MEPB*	5.2	>100
MAPB*	5.8	>>100
4COOHB	5.8	>>100
4FB	6.1	>>100
B14DA	6.9	40.0
4BPAPB	7.2	1.2
4MEOB	7.7	>100
2FDB*	8.0	>100
4TFMB	9.0	6.3
NAPB	10.4	34.0
9PHNB	12.6	31.0
2FORMB*	62.0	>100
<u>複素環式アリルボロン酸塩</u>		
TH2B	3.3	31.0
TH3B	17.0	100.0

表 2 B

ボロン酸塩	Ki <i>E. coli</i> AmpC (μM)	Ki <i>E. coli</i> TEM-1 (μM)
BZBTH2B	0.04	4.0
BZBF2B	0.07	8.0
5CLTH2B	1.4	17.0
5ACTH2B	1.8	>50
TH2B	3.3	31.0
3FTH2B	3.5	N. I.

N. I. = 100 μM 阻害濃度において阻害が見られなかった。

(54)

表 2 C

ボロン酸塩	IC50 (μM) 対	AmpC	CHT	TRY	ELST
TH2B		10.0	>200.0	>200.0	100.0

CHT=ウシ肝臓α-キモトリプシン、TRY=ウシ肝臓β-トリプシン、ELST=ブタ肝臓エラスターゼ

実施例 3 : 抗菌活性

細菌細胞培養試験を行い、臨床検査法標準化委員会 (NCCLS) (臨床検査法標準化委員会、嫌気状態で生育する細菌に対する希釈抗菌感受性試験法、認可基準 M7-A3、臨床検査法標準化委員会、ヴィラノヴァ (Villanova)、論文、1993 年) のガイドラインに従って解釈した。インキュベート後、細胞の生長を目で検査した。最小阻害濃度 (MIC) は、細胞の生長が観察されない最小濃度のことである。結果を以下の表に示す。

以下の菌株を使用した：ペータラクタマーゼの生産を抑制解除したエンテロバクター クロアカの細胞系 (Ent-Der) と、プラスミド pBGS19 (ペータラクタマーゼは有さない)、ペータラクタマーゼを含んだプラスミド pBGAmC (E. coli 由来の AmpC ペータラクタマーゼ、Eco-AmpC)、又はペータラクタマーゼを含んだプラスミド pBGAmC-MHN (エンテロバクター クロアカ由来の AmpC ペータラクタマーゼ、Eco-AmpCEnt) を有するエシェリヒア コリ RYC1000 (araD139 lcu169 rpsLDrib7 thi A gyrA recA56) の細胞系。プラスミド pBGAmC-MHN 及び pBGAmC は、

E. cloacae 及び E. coli の染色体 ampC 遺伝子の増幅と、それに続く pBGS18 へのクローニングにより構築した [スプラット ビー ジー、ヘッジ ピー アイ、ヒーセン エス、エデルマン エー、ブルームスミス ジェイ ケイ (Spratt, B. G. ; Hedge, P. I. ; Heesen, S. ; Edelman, A. ; Broome-Smith, J. K.), Gene, 第41巻、337-342 ページ、1986 年]。TEM-10 及び TEM-24 は TEM-1 の変異体である。TEM-10 及び TEM-24 は、以下の点が置換されているため TEM-1 とは異なっている：TEM-10 (R164S、E240K) ; TEM-24 (L102K、L162S、S235T、A237K)。また、TEM-10 及び TEM-24 は、酵素のスペクトルが伸びている (即ち酵素が TEM-1 よりも大きな範囲の基質と反応する) という点においても、TEM-1 とは異なっている。シュードモナス イル

(55)

ジノサ (*Pseudomonas aeruginosa*) を臨床用に単離したものについても試験した。すべての細菌株及びプラスミドはイエス ブラックツアンドフェルナンド バクエロ (Jesus Blazquez and Fernando Baquero)、セルヴィシオ デ ミクロバ イオロギア (Servicio de Microbiologia)、ホスピタル ラモン イ カヤル (Hospital Ramon y Cajal)、国立衛生研究所 (National Institute of Health)、スペインマドリード所在 (Madrid, Spain) より入手可能である。

ボロン酸阻害剤について最大 $128 \mu\text{g}/\text{ml}$ までの濃度にわたって試験を行った。1 : 1、2 : 1、4 : 1、及び 1 : 3 を含めたボロン酸化合物のベータラクタム抗生物質 [アモキシシリン (AX) 又はセフトジジム (CAZ)] に対する比を検定において使用した。タゾバクタム (TAZO) を、臨床で使用されるベータラクタマーゼ阻害剤であるが、ポジティブコントロールとして使用した。

表 3 A. セフトジジムと組み合わせた場合の、細菌細胞に対するボロン酸誘導体の活性

セフトジジム (CAZ) と、セフトジジムに阻害剤を加えたもの (割合 : 4 / 1) との MICs を $\mu\text{g}/\text{ml}$ で示す。使用した菌株は、プラスミド pBGS19 (ベータラクタマーゼを生産しない) を有する *E. coli* RYC1000 (ベータラクタマーゼを生

産しない)、プラスミド pBGTEM-24 (TEM-24 ベータラクタマーゼをコードしている、TEM-1 の変異体) 又はプラスミド pBGampC-MHN (エンテロバクタークロアカの AmpC ベータラクタマーゼをコードしている) を有する *E. coli* RYC1000、及びベータラクタマーゼを抑制解除したエンテロバクタークロアカ株 (Ent. Der.) である。「Tazo」はタゾバクタムであり、臨床で使用されるベータラクタムに基づくベータラクタマーゼ阻害剤である [レダール ラボラトリーズ社、ニューヨーク州パールリバー所在 (Lederle Laboratories, Pearl River, NY)]。

	CAZ	BIPD	9PINB	DETHFB	3NBP	TI12B	4BPAPB	BZBTH2B	5CLTH2B	TAZO
PBGS19	<0.5	<0.12	<0.25	0.5	<0.25	<0.25	<0.25	<0.25	<0.25	<0.25
TEM-24	256	256/64	256/64	256/64	128/32	256/64	256/64	128/32	128/32	8/2
AmpC-MHN	32	8/2	8/2	4/1	4/1	8/2	8/2	2/0.5	4/1	4/1
Ent. Der.	512	128/32	512/128	32/8	32/8	32/8	512/128	32/8	32/8	32/8

(56)

表 3 B. 単独で用いた場合の、細菌細胞に対するボロン酸誘導体の活性

セフトアジジムを使用しないで単独で使用情况の場合の阻害剤のMICsを $\mu\text{g}/\text{ml}$ で示す。菌株及びプラスミドは表 3 A に関するものと同じである。

	BIPD	9PHNB	DETHFB	3NPB	TH2B	4BPAPB	BZBTH2B	5CLTH2B
PBGS19	>256	128	>512	64	128	128	512	128
TEM-24	>256	128	>512	128	128	256	512	128
AmpC-MHN	>256	128	>512	256	128	256	512	128
Ent. Der.	>256	>512	>512	>512	256	>512	512	128

表 4 A. アモキシシリンと組み合わせた場合の、細菌細胞に対するボロン酸誘導体の活性

アモキシシリン (AX) と、アモキシシリンに阻害剤を加えたもの (割合: 4/1) とのMICsを $\mu\text{g}/\text{ml}$ で示す。使用した菌株は、ペーテラクターマーゼを生産しないプラスミドpBGS19を有するE. coli RYC1000 (EC)、TEM-1ペーテラクターマーゼを生産するpBGTEM-1を有するE. coli RYC1000 (EC-T1)、TEM-1の変異体である、TEM-10ペーテラクターマーゼを生産するpBGTEM-10を有するE. coli RYC1000 (EC-T10)、pBGampC-MHNを有するE. coli RYC1000 (EC-AmpCEn)、AmpCを生産するpBGampC-E. coliを有するE. coli RYC1000 (ECR-AmpCEc)、エンテロ

バクター由来のAmpCの変異物をコードするプラスミドを有するE. coli RYC1000 (ECR-AmpCEnM)、及びペーテラクターマーゼを抑制解除したエンテロバクタークロアカ (Ent-Der) である。

	AX	BIRD	DETHFB	9PHNB	3NPB	TH2B	TAZO
EC							
EC-T1	>2,048	256	512	512	256	128	8
EC-T10	>2,048	256	512	512	256	256	4
EC-AmpCEn	>2,048	128	32	256	64	32	16
ECR-AmpCEc	>2,048	128	128	512	64	64	32
ECR-AmpCEnM	>2,048	128	64	64	32	32	16
Ent-Der.	>2,048	256	256	512	256	64	128

表 4 B. 単独で用いた場合の、細菌細胞に対するボロン酸誘導体の活性

アモキシシリンを使用しないで単独で使用情况の場合の阻害剤のMICsを $\mu\text{g}/\text{ml}$ で示す。菌株及びプラスミドは表 4 A に関するものと同じである。化合物は 1

(57)

28 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を超える範囲については試験しなかった。ここでは、「256」は細胞生長の阻害が見られなかったことを示す。

	BIRD	DETHFB	9PHNB	3NPB	TH2B	TAZO
EC	256	256	256	256	64	32
EC-T1	256	256	256	64	64	32
EC-T10	256	256	256	128	128	64
EC-AmpCEn	256	256	256	256	128	64
ECR-AmpCEc	128	256	256	128	128	64
ECR-AmpCEnM	256	256	256	128	64	64
Ent-Der.	256	256	256	128	128	256

表 4 C. セフトジジムと組み合わせた場合の、シュードモナスイルジノサに対する TH2B の活性

阻害剤	微生物	発現したベータ ラクタマーゼ	MIC 細胞培養 CAZ のみ ($\mu\text{g}/\text{ml}$) ^a	MIC 細胞培養 CAZ/TH2B ($\mu\text{g}/\text{ml}$) ^a
TH2B	シュードモナス イルジノサ	AmpC (臨床単離物)	128	8/10

a. 臨床単離したシュードモナスイルジノサ (*Pseudomonas aeruginosa*) (ホスピタル ラモン イ カヤルより入手) に対する肉汁希釈アッセイ。阻害剤はセフトジジム (CAZ) と組み合わせて使用した。CAZ濃度は、TH2Bを10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の一定濃度にして、連続希釈により変化さ

せた。希釈平均は11の臨床単離物のものである。範囲は1/10 CAZ/TH2B ~ 64/10 CAZ/TH2Bとした。

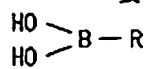
実施例 4 : ベータラクタマーゼの阻害に関する化合物の試験

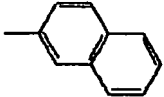
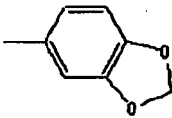
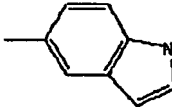
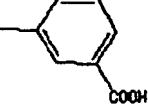
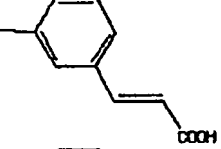
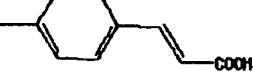
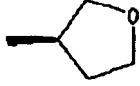
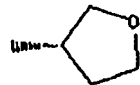
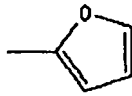
実施例 2 に述べたように、AmpCベータラクタマーゼの阻害に関して、更なる化合物について試験した。その結果を以下の表 5 に示す。表 5 中の最後の 2 つの化合物は、キーオーガニック社、イギリス、コーンウォール所在により合成された。表 5 の他の化合物は、ランカスターシンセシス社、ニューハンプシャー州ウィンダム所在 (Lancaster Synthesis, Windham, NH)、オールドリッチケミカル社、ウィスコンシン州ミルウォーキー所在 (Aldrich Chemical, Milwaukee, WI)、又はフロンティアサイエンティフィック社、ユタ州ローガン所在 (Frontier Scien

(58)

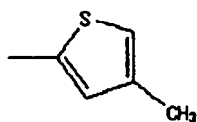
tific, Logan, UT) より入手した。

表 5

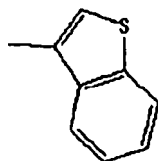


<u>R</u>	<u>KiAmpC(μM)</u>
	8.5±1.8
	53.4±6.1
	10.9±0.6
	>>100
	5.9±0.3
	4.2±1.1
	1.4±0.1
	15.8±0.8
	>>100

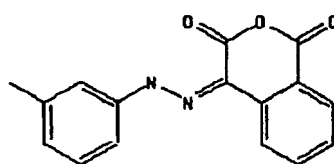
(59)



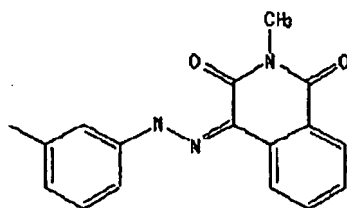
0.50±0.05



0.78±0.08



0.075



0.075

実施例 5 : 抗菌活性

実施例 3 に述べたように、ペータラクタム抗生物質としてCAZを用いて、広範な細菌に対して二つの化合物 (BZB及びTH2B) を試験した。すべての細菌株及びプラスミドはイエス ブラックツアンドフェルナンドバクエロ (Jesus Blazquez and Fernando Baquero)、セルヴィシオ デ ミクロバイオロギア (Servicio de Microbiologia)、ホスピタル ラモン イ カヤル (Hospital Ramon y Cajal)、国立衛生研究所 (National Institute of Health)、スペインマドリード所在 (Madrid, Spain)、より入手可能である。この結果を以下の表 6 に示す。

表 6

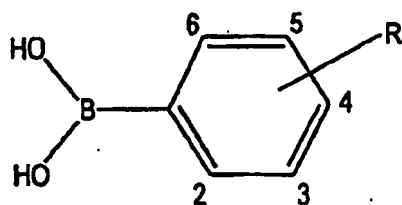
(60)

<u>細菌種/発現酵素</u>	CAZ	BZB	CAZ-	CAZ-
	<u>のみ</u>	<u>のみ</u>	<u>BZB</u>	<u>TH2B</u>
MC4100/AmpC-Enter	32		1	4
MC4100/AmpC-E. coli	8		1	2
MC4100/AmpC-Enter (OmpR-)	32		1	4
MC4100/AmpC-E. coli (OmpR-)	8		2	2
MC4100/AmpC-Enter (OmpC-)	16		1	2
MC4100/AmpC-E. coli (OmpC-)	16		1	2
MC4100/AmpC-Enter (OmpF-)	32		1	4
MC4100/AmpC-E. coli (OmpF-)	32		1	2
シュードモナス イルジノサー 1 (臨床単離物)	8	512	8	
シュードモナス イルジノサー 2 (臨床単離物)	32	512	4	
シュードモナス イルジノサー 3 (臨床単離物)	64	512	4	
抑制解除したエンテロバクター クロアカ (臨床単離物)	16	128	2	
抑制解除したエシェリヒア コリ (臨床単離物)	16	128	2	
抑制解除したシトロバクター フロインディ (臨床単離物)	16	128	2	

MC4100はアメリカンタイプカルチャーコレクション社、メリーランド州ロックヴィル所在 (American Type Culture Collection, Rockville, MD) より入手可能な所蔵番号35695のE. coliの菌株である。AmpCプラスミドについては実施例3を参照のこと。OmpC及びOmpFはポーリンチャンネルの発現に関連するポーリンチャンネルタンパク質である。OmpRはOmpF及びOmpCの発現を支配する調節タンパク質である。「-」は野生細菌株が通常備えたこれらのタンパク質のうちの一つを欠いた変異を示す。臨床単離物は、スペインマドリッド所在のホスピタル ラモンイカヤル (Hospital Ramon y Cayal in Madrid, Spain) より入手した。

(61)

【図 1】



位置	R	記号
-	NONE	2FDB
2	-CHO	2FORMB
3	-NH ₂	MAPB
4	-CHO	4FORMB
4	-CH ₃	4MEPB

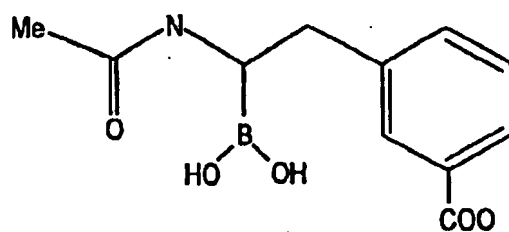


FIG. 1A

【図1】

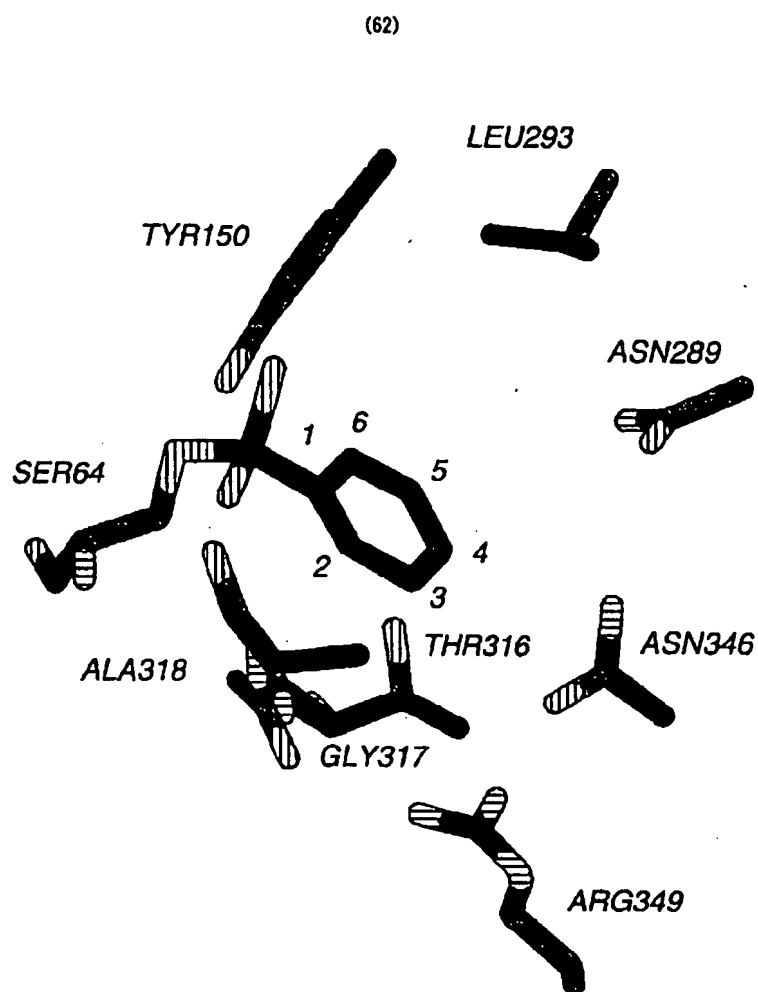
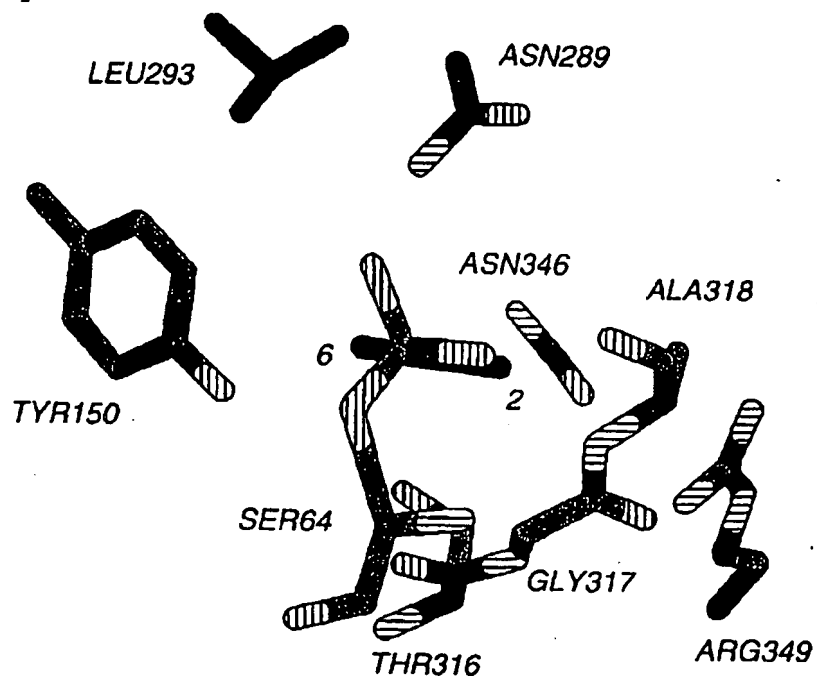


Fig. 1B

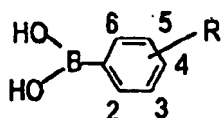
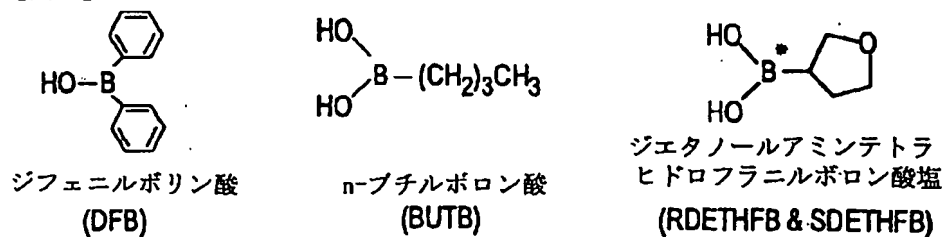
(63)


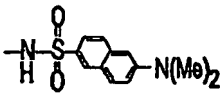
【図 1】


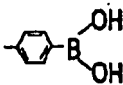
**Fig. 1C**

(64)

【図 1】



位置	R	記号
—	なし	2FDB*
2	-CHO	2FORMB*
3		3TFMB
3		NSULFB*
3	-NO ₂	3NPB*
3	-NH ₂	MAPB*
4	-CH ₃	4MEPB*
4	-CO ₂ H	4COOHB
4	-F	4FB

位置	R	記号
4	B(OH) ₂	B14DA
4	-OCH ₃	4MEOB
4	-CHO	4FORMB
4		4TFMB
4	-Br	4BPB
4		BIPD
2,5	2: -OH 5: -N=N-CF ₃	HFAB
2,5	2: -OH 5: -N=N-Br	4BPAPB

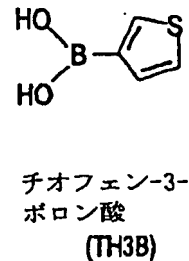
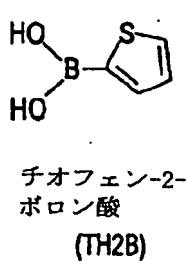
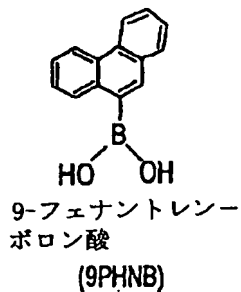
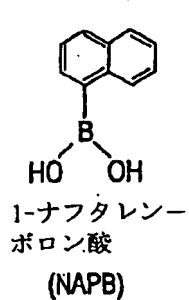


FIG. 1D

(65)

【図 1】

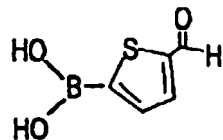
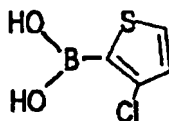
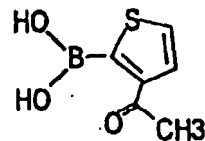
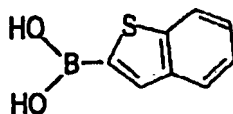
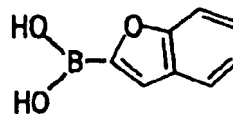
3-ホルミルチオフェン-2-
ボロン酸 (3FTH2B)5-クロロチオフェン-2-
ボロン酸 (5CLTH2B)5-アセチルチオフェン
-2-ボロン酸 (5ACTH2B)ベンゾ [b] チオフェン
-2-ボロン酸 (5ZBTH2B)ベンゾ [b] フラン-2-
ボロン酸 (BZBF2B)

FIG. 1E

(66)

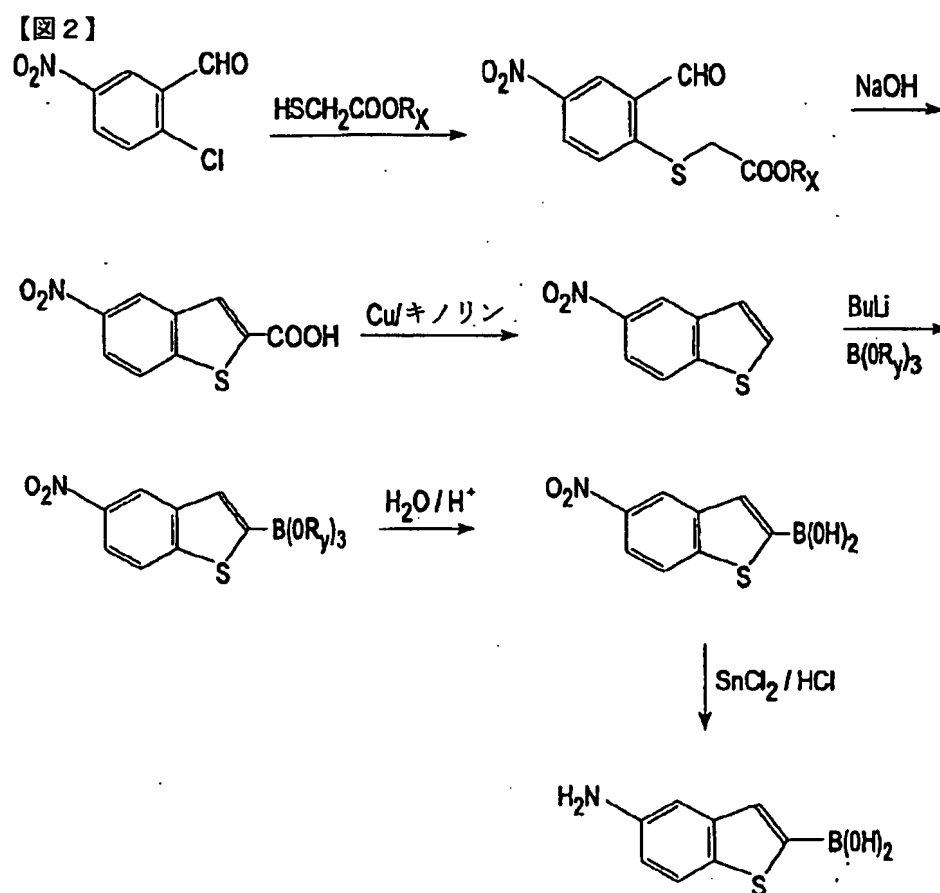


FIG. 2A

(67)

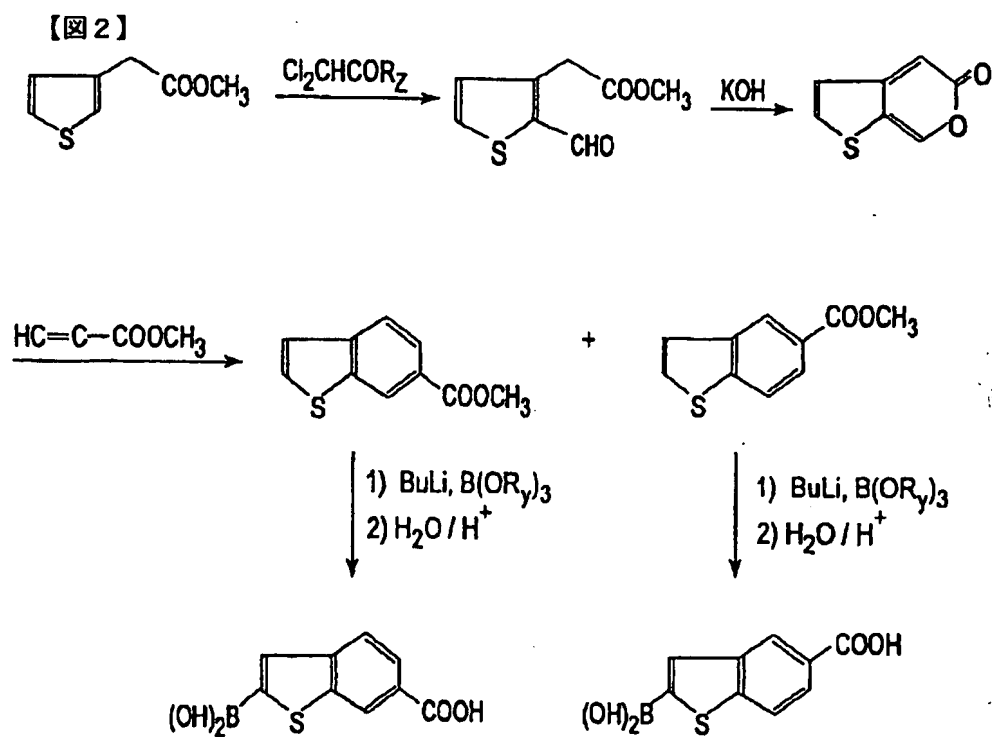


FIG. 2B

(68)

【図 2】

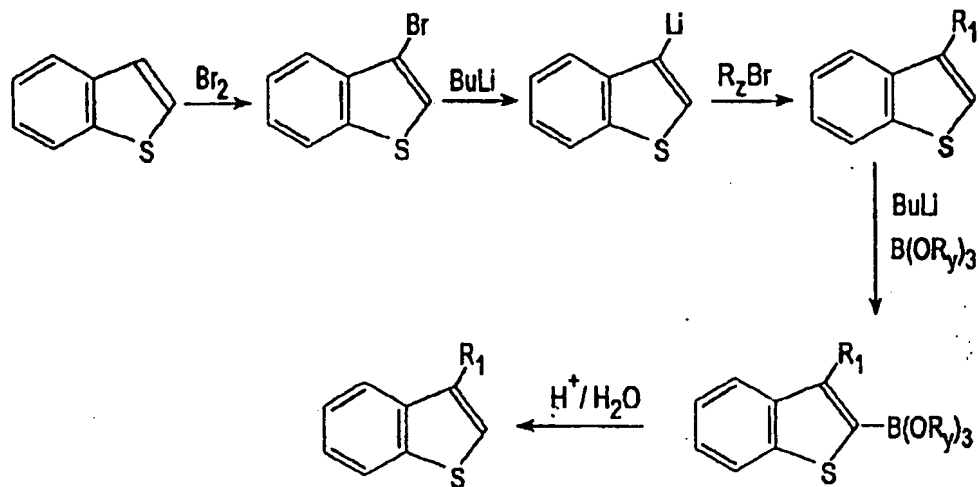
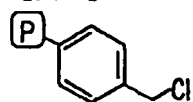


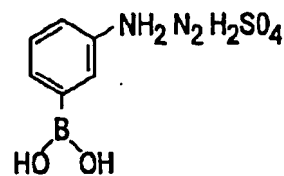
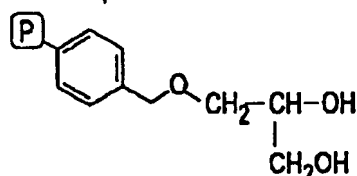
FIG. 2C

(69)

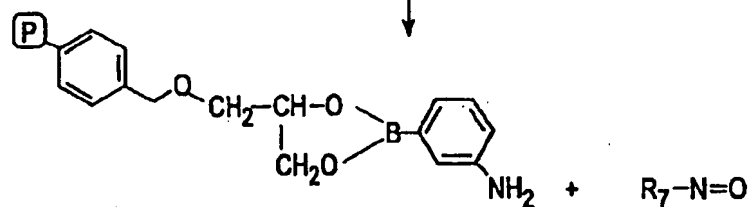
【図 3】



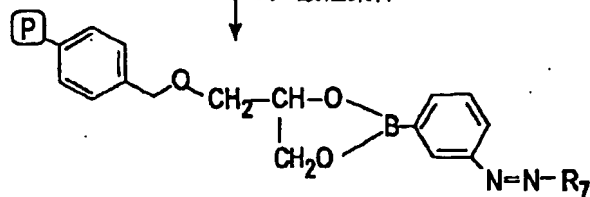
↓ レツノフ & ウォン (Leznoff & Wong), Can. J. Chem. 第 51 巻、
1973 年、3755-3764 ページ参照*)



無水アセトン、溜流△



- 1) 低温
2) 酸性条件



- 1) 樹脂を反応物から洗浄
2) 開裂
3) 樹脂を濾過

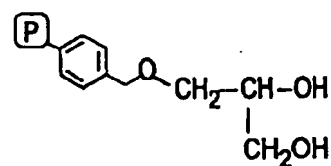
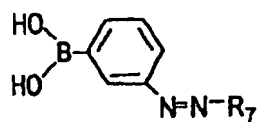


FIG. 3

(70)

【図 4】

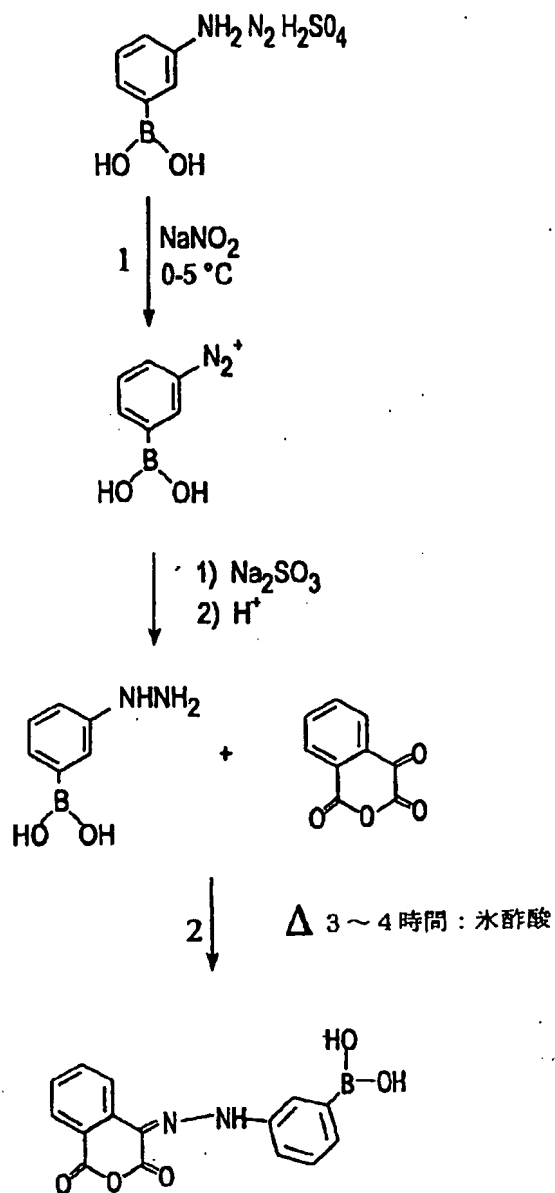


FIG. 4A

(71)

【図 4】

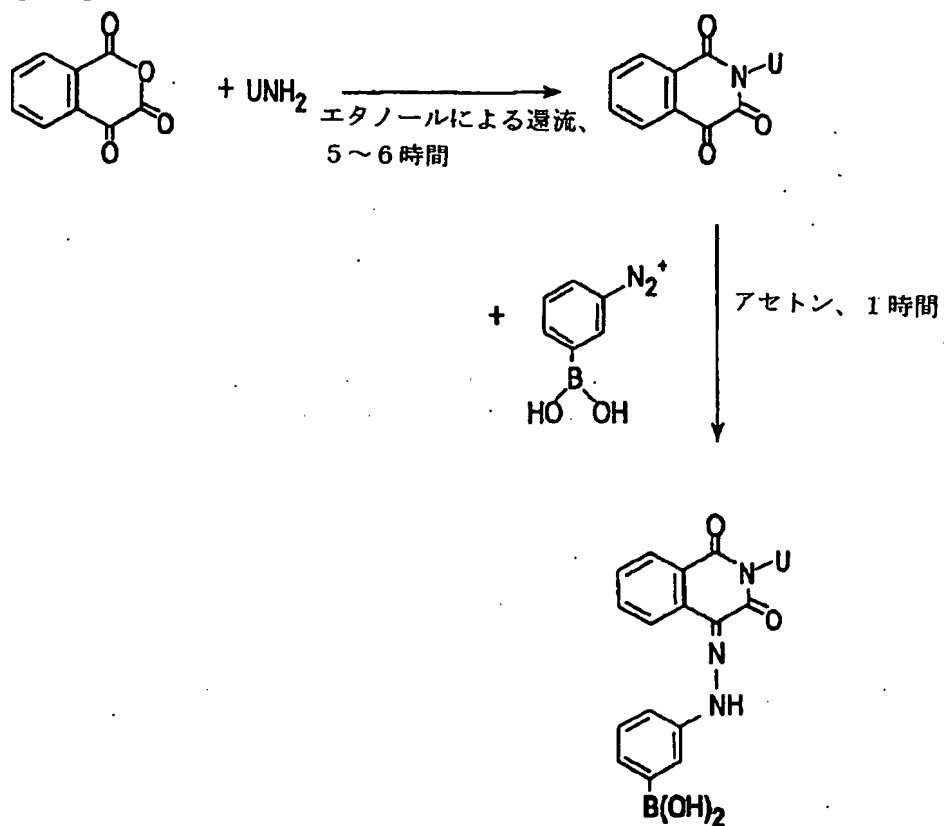


FIG. 4B

(72)

【図 5】

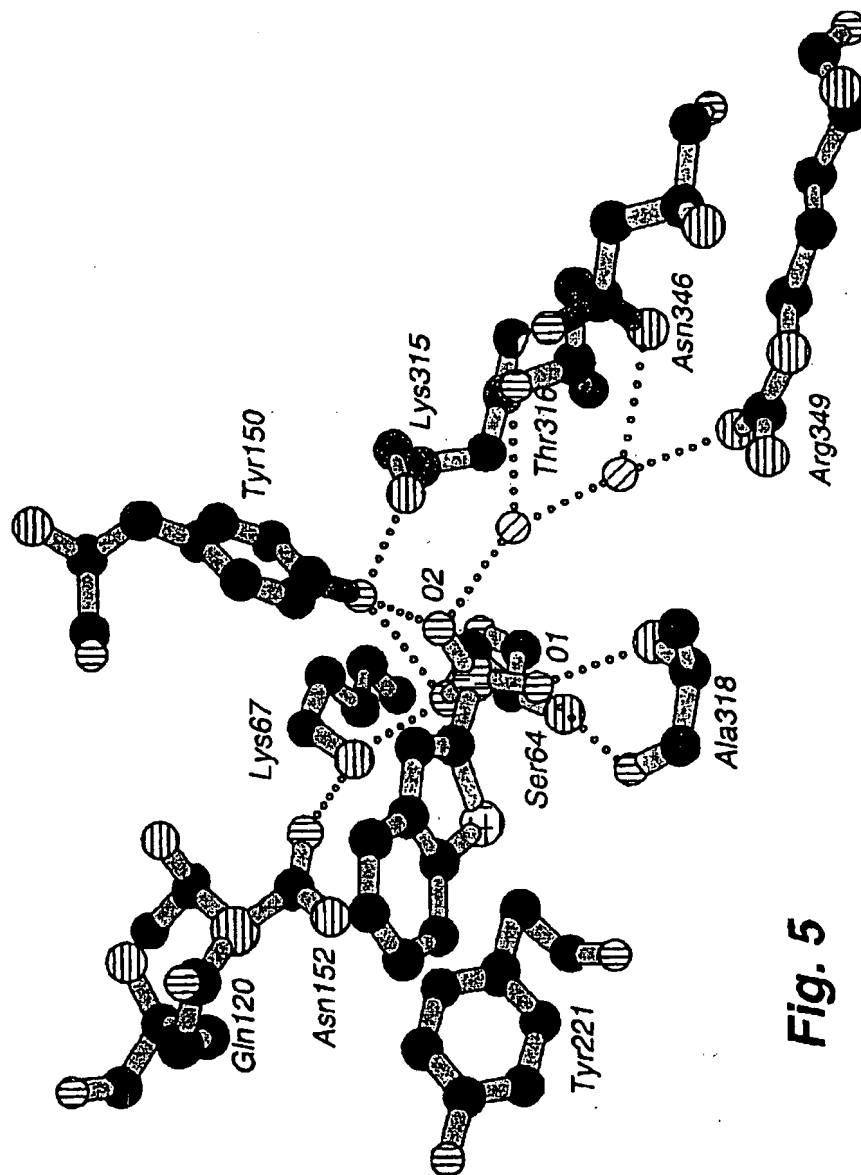


Fig. 5

(73)

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP98/12096

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(6) : A61K 33/22, 31/40, 31/403, 31/38, 31/34, 31/18 US CL : 424/657; 514/408, 415, 438, 461, 601 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 424/657; 514/408, 415, 438, 461, 601 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched NONE Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) APS, CAS-ONLINE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claims No.
X	Chemical Abstracts, Volume 87, No. 3 issued 18 July 1977, VAN WERSH et al., "1-Hydroxybenzo-2,3,1-diazaborine derivative", see page 456, column 1, abstract no. 23334x, Ger. Offen 2,533,918, 6 pp, see abstract.	1-39
X	Chemical Abstracts, Volume 99, No. 17 issued 24 October 1983, BEESLEY et al., "The inhibition of class C beta-lactamases by boronic acids." see page 271, column 1 abstract no. 135992q, Biochem. J., 209(1), 229-233, see abstract.	1-39
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family sheet.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "B" earlier documents published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another claim(s) or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "T" documents published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understate the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "A" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 11 SEPTEMBER 1998		Date of mailing of the international search report 16 OCT 1998
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703) 305-1230		Authorized officer KEVIN E. WEDDINGTON Telephone No. (703) 308-1235

Form PCT/ISA/210 (second sheet)(July 1997)*

(74)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US98/12096

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Chemical Abstracts, Volume 122, No. 19 issued 08 May 1995, MARTIN et al., "Inhibition of the RTEM-1 beta-lactamase by boronic acids", see page 471, column 2, abstract no. 234072q, Bioorg. Med. Chem. Lett., 4(10), 1129-1234, see abstract	1-39

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet)(July 1992)

(75)

フロントページの続き

(81) 指定国 EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, I T, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, KE, L S, MW, SD, SZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, E E, ES, FI, GB, GE, GH, GM, GW, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, M D, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, UZ, V N, YU, ZW